



V СЪЕЗД БИОФИЗИКОВ РОССИИ

**4-10 октября 2015 г.
Ростов-на-Дону,
Южный федеральный университет**

**МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ
том 1**

Ростов-на-Дону · 2015

УДК 577.3

ББК 28

С11

С11 V Съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т – Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2015.

ISBN 978-5-9275-1656-8

Т. 1; 2015. – 398 с.

ISBN 978-5-9275-1657-5 (Т.1)

Представлены материалы V Съезда биофизиков России. Основные направления съезда: структура и динамика белков и их комплексов; структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов; биофизика клетки; мембранные процессы; биологическая подвижность; молекулярные моторы; механизмы трансформации энергии, биофизика одиночных молекул; нанобиотехнологии; нейродинамика и нейробиология; биофизическое образование.

Сборник предназначен для биофизиков, биохимиков, молекулярных биологов, специалистов, работающих в различных областях физико-химической биологии. Он может быть также полезен для студентов и аспирантов, специализирующихся в данной отрасли знаний.

Ответственные редакторы: чл.-корр. РАН А.Б. Рубин, проф. А.Б. Узденский, М.В. Рудновский

Проведение V Съезда биофизиков России поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-04-20706)



ISBN 978-5-9275-1657-5 (Т.1)

ISBN 978-5-9275-1656-8

УДК 577.3

ББК 28

Южный федеральный университет, 2015

Организаторы Съезда

Российская академия наук
Отделение биологических наук РАН
Министерство Образования и Науки РФ
Научный совет РАН по биологической физике
Национальный комитет Российских биофизиков
Южный федеральный университет
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Институт биофизики клетки РАН
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Институт молекулярной биологии РАН

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:

Рубин А.Б., член-корр. РАН – сопредседатель
Боровская М.А., ректор ЮФУ – сопредседатель
Узденский А.Б., профессор, д.б.н. – зам. председателя
Иваницкий Г.Р., член-корр. РАН – зам. председателя
Фесенко Е.Е., член-корр. РАН – зам. председателя
Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н. – зам. председателя
Штранкфельд И.Г., к.б.н. – ответственный секретарь

Артюхов В.Г. , проф., д.б.н.	Колчанов Н.А. , академик
Бурлакова Е.Б. , проф., д.б.н.	Комаров В.М. , проф., д.б.н.
Владимиров Ю.А. , академик	Коновалов А.И. , академик
Василевский Ю.В. , проф., д.ф.-м.н.	Макаров А.А. , академик
Воденев В.А. , д.б.н.	Намиот В.А. , проф., д.ф.-м.н.
Волотовский И.Д. , академик НАН Беларуси	Никольский Н.Н. , академик
Гительзон И.И. , академик	Островский М.А. , академик
Говорун В.М. , чл.-корр. РАН	Розанов А.Ю. , академик
Готтих Б.П. , проф., д.х.н.	Савитский А.П. , проф., д.х.н.
Григорьев А.И. , академик	Скулачев В.П. , академик
Гурский Г.В. , чл.-корр. РАН	Твердислов В.А. , проф., д.ф.-м.н.
Гусев Н.Б. , чл.-корр. РАН	Ткачук В.А. , академик
Дегерменджи А.Г. , академик	Туманян В.Г. , проф., д.ф.-м.н.
Есипова Н.Г. , к.ф.-м.н.	Черенкевич С.Н. , академик НАН Беларуси
Иванов В.Т. , академик	Чизмаджев Ю.А. , чл.-корр. РАН
Кирпичников М.П. , академик	Шувалов В.А. , академик

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:

Рубин А.Б., член-корр. РАН – председатель

Есипова Н.Г., канд. физ.-мат. наук – зам. председателя

Антонов В.Ф., проф., д.б.н.

Атауллаханов Ф.И., проф., д.б.н

Бурлакова Е.Б., проф., д.б.н.

Ванин А.Ф., проф., д.ф.-м.н

Вашанов Г.А., проф., д.б.н.

Василевский Ю.В., проф. д.ф.-м.н.

Владимиров Ю.А., академик

Воденеев В.А., д.б.н.

Гельфанд М.С., проф. д.б.н.

Гречкин А.Н., акад.

Зинченко В.П., д.ф.-м.н.

Иваницкий Г.Р., чл.-корр. РАН

Колесников С.С., проф., д.б.н.

Комарова Л.Ф.

Красавин Е.А., проф., д.б.н.

Крицкий М.С., проф., д.б.н.

Литвин Ф.Ф., проф., д.б.н.

Макеев В.Ю., д.ф.-м.н.

Максимов Г.В., проф., д.б.н.

Намиот В.А., проф., д.ф.-м.н.

Подлубная З.А., проф., д.б.н.

Ризниченко Г.Ю., проф., д.ф.-м.н.

Романовский Ю.М., проф., д.ф.-м.н.

Рощупкин Д.И., проф., д.б.н.

Сергеев А.М., член-корр. РАН

Слобожанина Е.И., чл.-корр. НАН Беларуси

Соболев А.С., проф., д.б.н.

Твердислов В.А., проф., д.ф.-м.н.

Туманян В.Г., проф., д.ф.-м.н.

Узденский А.Б., профессор, д.б.н.

Фесенко Е.Е., чл.-корр. РАН

Финкельштейн А.В., проф.,чл.-корр. РАН

Хрущев С.С.

Цатурян А.К., д.ф.-м.н.

Черенкевич С.Н., акад. НАН Беларуси

Чернавский Д.С., проф. д.ф.-м.н.

Шайтан К.В., проф., д.ф.-м.н.

Штранкфельд И.Г., к.б.н.

Ягужинский Л.С., проф., д.б.н.

Яминский И.В., проф., д.ф.-м.н.

Яхно В.Г., проф., д.ф.-м.н.

Оглавление

Том 1

ОРГАНИЗАТОРЫ СЪЕЗДА.....	3
ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ:	3
ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ:	4
ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ.....	7
СТРУКТУРА И ДИНАМИКА БЕЛКОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ	59
СТРУКТУРА И ДИНАМИКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПЛЕКСОВ	131
БИОФИЗИКА КЛЕТКИ. МЕМБРАННЫЕ ПРОЦЕССЫ	165
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ.....	227
МЕХАНИЗМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ: МИТОХОНДРИИ, ФОТОСИНТЕЗ	245
БИОФИЗИКА ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ. НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ	295
НЕЙРОДИНАМИКА И НЕЙРОБИОЛОГИЯ	343
БИОФИЗИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ	383
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	390

Том 2

БИОИНФОРМАТИКА И СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ	7
НОВЫЕ МЕТОДЫ В БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	33
ДЕЙСТВИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.....	67
ФОТОБИОЛОГИЯ. БИОФОТОНИКА	127
МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА	199
БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ.....	299
ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА	341
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	381

НАШИ СПОНСОРЫ

SIGMA-ALDRICH[®]

ДИА•М
современная лаборатория

Nikon

Пленарные доклады

HIDDEN ASPECTS OF PHOTOSYNTHESIS LIGHT HARVESTING

Leiger, Kristjan 1, Freiberg Arvi 1,2

1 – Institute of Physics, Tartu University, Ravila 14c, 51011 Tartu, Estonia;

2 – Institute of Molecular and Cell Biology, Tartu University, Riia 23, 51014 Tartu, Estonia

Phone: +372 56453175; e-mail: arvi.freiberg@ut.ee

Weak up-converted fluorescence related to bacteriochlorophyll-a was recorded from various light-harvesting pigment–protein complexes as well as from the functional membranes (chromatophores) of photosynthetic purple bacteria under relatively low power continuous-wave infrared laser excitation, far outside all the optically allowed singlet absorption bands of the chromophore. The fluorescence increases linearly with the excitation power, clearly distinguishing it from the previously observed two-photon excited fluorescence upon femtosecond pulse excitation. We have critically analyzed three possible mechanisms for arising of the fluorescence: (i) one-photon absorption mediated by the thermally activated vibrations in the ground state, (ii) two-photon absorption, and (iii) delayed fluorescence. The first interpretation appears to be disqualified by the inverse thermal dependence of the emission intensity, while the second explanation, by the linear dependence between the excitation and emission intensities, leaving the delayed fluorescence involving intermediate long-lived quantum states as the only viable option. Unique identification of the nature of the intermediate energy level(s), however, appears difficult, since the choice is between the closely coupled triplet states of the carotenoid and bacteriochlorophyll-a molecules. Two possible mechanism of the delayed fluorescence will be discussed: (i) two-step triplet state mediated excitation and (ii) triplet–triplet annihilation. Both these mechanisms show linear excitation intensity dependence under appropriate choice of model parameters [1].

1. Leiger, K. and Freiberg, A., Photosynth. Res., 2015. DOI 10.1007/s11120-015-0117-x.

ПАССИВНОЕ ОЖИДАНИЕ И МЕЖСЕНСОРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ**Passive expectancy and sensory interaction****Айдаркин Е.К.**

Южный федеральный университет, 344090, Ростов-на-Дону, пр.Стачки, 194/1
Тел. 8(863)228-47-90, aek@sfedu.ru

Важным элементом поведения человека являются упорядоченные последовательности сенсомоторных реакций, интегрируемые в устойчивые стереотипы с помощью последовательных эффектов, которые реализуются рядом механизмов, связанных, в первую очередь, с активным и пассивным ожиданием текущего стимула и подготовкой двигательной реакции. Хорошо изучен ряд основных факторов, определяющих выраженность пассивных последовательных эффектов (привыкание, глобальная и локальная вероятность стимула в последовательности, межстимульный интервал (МСИ), интервал между целевыми и нецелевыми стимулами, взаимоотношение сенсорных и моторных стимулов и т.д.), их сочетание может носить как синергичный, так и антагонистический характер. Однако практически отсутствуют исследования такого последовательного эффекта, как межмодальное взаимодействие чередующихся разномодальных стимулов при изменении их локальной вероятности, что явилось целью исследования.

Анализ экспериментальных данных выявил влияние привыкания, девиации МСИ, локальной вероятности на время реакции (ВР), связанный с событием потенциал и латеральный потенциал готовности. Исследование межмодальных отношений было связано с оценкой влияния предшествующих мономодальных стимулов на текущий стимул альтернативной модальности. При условии среднелатентных ВР ($550 > \text{ВР} > 250$ мс) увеличении количества предшествующих стимулов было связано с ростом компонент Р3а и Р3b, а для зрительного стимула было характерно дополнительное усиление С1. При коротких ВР ($\text{ВР} < 250$ мс) наблюдался значительный рост CNV, «межмодальных» MMN, Р3а и Р3b.

Обсуждаются вопросы взаимодействия зрительного и слухового стимулов в условиях разрушения следа памяти, нарушения порядка следования стимулов в серии, при сенсорном и моторном прогнозировании.

ЛИПИДОЦЕНТРИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИИ МОДЕЛЬНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

A lipocentric concept of the permeabilization mechanism of model and cell membranes

Антонов В.Ф.

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, ул. Трубецкая 2

Тел.: +7(499)-367-18-72; e-mail: vantov@mail.ru

Одной из важнейших функций клеточной мембраны является регуляция ионной проницаемости живой клетки. До недавнего времени эта функция приписывалась исключительно встроенным в липидный бислой белкам-каналоформерам. В 1980 году в нашей лаборатории впервые были обнаружены квантизованные флуктуации тока, внешне неотличимые от флуктуаций тока в белках-каналоформерах, в чисто липидных бислоевых мембранах при температуре фазового перехода липида (1). В шкале амплитуд флуктуации тока находились в наноамперном диапазоне, в шкале времени жизни – доли секунды. В БЛМ из индивидуальных липидов или их смеси – дистеароилфосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин, гидрированный яичный лецитин – флуктуации тока регистрировались в узком диапазоне температур вблизи точки основного фазового перехода липида из жидкокристаллического состояния в гель. Изучение проводимости одиночных липидных пор для ряда одновалентных катионов выявило закономерное расположение проводимостей в ряду $g_{Li} > g_{Na} > g_K > g_{Rb} > g_{Cs}$, что совпадает с 11 рядом в классификации Эйзенмана. Независимая оценка среднего размера липидной поры, проведенная с помощью блокирования проводимости липидных пор молекулами полиэтиленгликоля в диапазоне от 0,7 нм (ПЭГ300) до 2.2 нм (ПЭГ6000), показала, что радиус липидной поры равен ~1 нм. В совокупности полученные данные указывают на то, что чисто липидные поры, регистрируемые при температуре фазового перехода мембранных липидов, представляют собой стабильные гидрофильные поры близкие по размеру порам клеточной мембраны. Обнаруженное сходство между порами, индуцированными пептидами и белками, и липидными порами при фазовом переходе липидов, позволяет предположить существования единого источника порообразования в виде тепловых флуктуаций липидных молекул. В рамках липидоцентрической концепции амфифильные белки и пептиды принимают участие в образовании трансмембранных пор косвенно, путем воздействия на фазовое состояние мембранных липидов. Такая точка зрения получила экспериментальное подтверждение при исследовании митохондриального апоптоза, где ключевым механизмом является липидная пора тороидального типа в наружной мембране митохондрии, доступная для выхода в цитоплазму молекулы цитохрома с. Первоначально такие поры были обнаружены Гарсиа-Саец и др. (2) при включении в липидный бислой спиральных участков 5 и 6 молекулы ВАХ. Однако совсем недавно Бергстрем и др. (3) показали, что тороидальные липидные поры, обеспечивающие выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму, появляются спонтанно без участия молекул ВАХ в результате электростатического взаимодействия цитохрома с и кардиолипина. Эта модель подтверждается нашими данными (4) при изучении встраивания молекул цитохрома с в кардиолипин-содержащую БЛМ и данными, полученными в лаборатории Антоненко (5) в опытах на кардиолипин-содержащих липосомах.

1. Antonov, V.F., Petrov, V.V., et al., Nature, 1980, vol. 283, pp. 585-586.
2. Garcia-Saez, A.J., FEBS J., 2006, vol. 273, pp. 971-981.
3. Bergstrom, C.L., Beales P.A., et al., PNAS, 2013, vol. 110, pp. 6269-6274.
4. Antonov, V.F., Puchkov, M.N., et al., Europ. Biophys. J., 2014, vol. 43, pp. 469-476.
5. Firsov, A.M., Kotova, E.A. et al., BBA, 2015, vol. 1848, pp. 767-774.

ЭВРИСТИЧЕСКИЕ НЕЙРОСЕТЕВЫЕ МОДЕЛИ И КЛЮЧЕВЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОФИЗИКИ**Heuristic neural network models and key problems of biophysics****Барцев С.И., Гительзон И.И., Дегерменджи А.Г.**Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок 50 стр.50
Тел.: +7(913)534-77-43; факс: +7(3912)43-34-00; e-mail: bartsev@yandex.ru

В биологии и биофизике существуют фундаментальные понятия, которые широко употребляются в исследованиях, но с трудом поддаются формализации: структура, функция, сложность, эволюция и другие. В этих понятиях выражаются ключевые проблемы биофизики: структурно-функционального соответствия, уникальности и воспроизводимости биологических экспериментов, эквививальности эволюционных исходов и ряд других. Для работы с этими проблемами требуется высокий уровень обобщения, которого трудно достичь при изучении реальных биологических систем. Дело в том, что во-первых, чрезвычайная сложность реальных биологических объектов приводит к невозможности учета того огромного количества взаимодействий, которое определяет функцию и свойства этих объектов; во-вторых, единственность эволюционных исходов не позволяет использовать один из самых эффективных инструментов исследования – сравнительный анализ биологических структур.

Один из способов работы с подобными сложными объектами, названный эвристическим методом, был предложен Дж. фон Нейманом [1, стр. 98-99]. Сущность этого метода заключается в том, что вместо исследования биологических систем работа ведется с абстрактными компьютерными моделями этих систем для того, чтобы выявить удобные понятия, широко приложимые принципы и построить, в конечном счете, общую теорию. В данной работе в роли эвристических модельных объектов рассматриваются нейронные сети. Биологические основания такого выбора следуют из высказывания Дж. Бернала [2]: «биология методологически отличается от других естественных наук тем, что в фокусе внимания находятся, прежде всего, *функционалирование* и эволюция систем. Структура здесь имеет значение только в связи с функцией и происхождением. ... Происхождение, структура и функция теперь уже не могут быть разделены». Достоинством нейросетей как эвристических моделей является то, что для нейронных сетей легко определить функцию, выделить структуру и запустить процесс обучения, формальное описание которого по ряду ключевых признаков аналогично описанию эволюционного процесса.

На основе анализа структур ансамблей нейронных сетей, выполняющих одинаковую функцию, выделены сохраняющие ее преобразования структуры и предложены понятия функциональной симметрии и функционального инварианта структуры. На основании того, что процесс формирования структуры нейронной сети, предназначенной для выполнения заданной функции, представляет собой поиск экстремума целевой функции (функции приспособленности), то появляется формальная возможность построить аналог функции Лагранжа, удовлетворяющий уравнению Лагранжа-Эйлера и описывающий процесс обучения (и эволюции), как перемещенное движение частицы в механике. Очевидно, что аналогия между свойствами нейросетевых модельных объектов и реальных систем, не может служить основанием для механического распространения полученных результатов на биологические системы. Однако эти результаты имеют эвристическое значение и позволяют сформулировать ряд предположений или гипотез об общих свойствах биологических систем.

1. Фон Нейман, Дж., Теория самовоспроизводящихся автоматов, М.: Мир, 1971, 382 с.
2. Бернал, Дж.Д., Молекулярная структура, биохимическая функция и эволюция, в кн. Теоретическая и математическая биология, М.: Мир, 1968, сс. 110–151.

МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ СВЕТОВОМ И МЕХАНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Membrane transport and signal transmission in the plant cell under localized radiative and mechanical impacts

Булычев А.А., Комарова А.В., Рубин А.Б.

Биологический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-35-03; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Метаболизм фотосинтезирующей клетки тесно связан с транспортом H^+ . Наиболее известна роль потоков H^+ между тилакоидами и стромой в регуляции фотохимического использования световой энергии, электронного транспорта и темновых ферментативных реакций. В клетках модельного фотосинтезирующего объекта *Chara corallina* протоны участвуют также в образовании на свету доменной структуры, в ближних и дальних взаимодействиях хлоропластов с плазмалеммой, межпластидной сигнализации и в ответных реакциях на микроповреждение. Локальное освещение и микроперфорация клеточной стенки вызывают формирование внешне сходных щелочных зон на поверхности междоузлий. Вместе с тем, щелочные зоны, возникающие при фото- и механостимуляции по разному реагируют на повышение $[Ca^{2+}]_c$, а также на действие ингибитора микротрубочек оризалина. Процессы, запускаемые при поглощении света хлоропластами, включают стадию дальней передачи сигнала с потоком цитоплазмы. В отличие от этого, при трансформации сигналов, вызванных возникновением микродефекта в клеточной стенке, преобладает диффузия интермедиата в цитоплазме. Выявленные различия, по-видимому связаны с тем, что использованные локальные воздействия модифицируют состав разных слоев цитоплазмы. Механический стимул открывает ионные каналы плазмалеммы, что сказывается, прежде всего, на составе неподвижной эктоплазмы, тогда как фотоиндуцированный обмен метаболитов через оболочку хлоропластов происходит наиболее активно со стороны подвижной эндоплазмы, непрерывно омывающей внутреннюю сторону слоя хлоропластов. В связи с этим при механостимуляции щелочная зона возникает по центру от точки микроукола, а при действии узкого луча движение цитоплазмы смещает щелочную зону к границе света и тени. Ранние стадии ответа на микроукол включают: (1) натяжение плазмалеммы при её вдавлении под влиянием тургорного давления в область микродефекта клеточной стенки, (2) открывание активируемых растяжением каналов и повышение $[Ca^{2+}]_c$ и (3) стимулирующее влияние Ca^{2+}_c на перенос H^+ через плазмалемму. Локальное освещение участка клетки, расположенного выше в потоке цитоплазмы, приводит к дополнительному возрастанию наружного рН (pH_o) в области перфорации, причем повышение pH_o происходит синхронно с возрастанием флуоресценции хлорофилла F' . Волна возрастания F' отражает латеральный перенос восстановительных эквивалентов с потоком цитоплазмы из участка локального освещения в область затенения [1]. Полученные данные указывают на то, что возрастание pH_o при микроперфорации обусловлено поглощением H^+ при восстановлении O_2 до воды с участием Ca^{2+} -зависимой NADPH оксидазы плазмалеммы. Обсуждаются взаимодействия хлоропластов с транспортными системами плазмалеммы.

1. Bulychov, A.A. and Komarova, A.V., BBA Bioenergetics, 2015, vol. 1847, pp. 379-389.

**ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ТИОЛ-СОДЕРЖАЩИМИ ЛИГАНДАМИ
– «РАБОЧАЯ ФОРМА» ОДНОГО ИЗ ВАЖНЕЙШИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ УНИВЕРСАЛЬНЫХ
РЕГУЛЯТОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ – МОНОКСИДА АЗОТА**

Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands are “working form” of nitrogen monoxide, important representative of universal signaling agents

Ванин А.Ф.

Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул.Косыгина, 4.
Тел.: +7(495)939-7535, факс: +7(495)651-2191, e-mail: vanin@polymer.chph.ras.ru

Обсуждается одно из важнейших предположений, касающихся биологии оксида азота (NO), а именно, утверждение о том, что в живых системах один из универсальных регуляторов биологических процессов – NO, запасается, транспортируется и функционирует в форме моно- и биядерных динитрозильных комплексов железа (соответственно, М- и Б-ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами. Как доноры биологически активных молекул NO и их ионизованной формы – ионов нитрозония (NO⁺) М- и Б-ДНКЖ характеризуются разнообразной биологической активностью, характерной для системы эндогенного NO. Как и последняя, в микромолярных стационарных концентрациях эти комплексы оказывают на клетки и ткани положительное регуляторное действие, в частности, вызывают расслабление кровеносных сосудов и как следствие этого – гипотензию, подавляют агрегацию тромбоцитов, повышают эластичность эритроцитов и тем самым улучшают микроциркуляцию, снижают зону риска при экспериментальном инфаркте миокарда, ослабляют отрицательное действие на миокард процедуры ишемии-реперфузии, вызывают длительную эрекцию пениса, ускоряют заживление кожных ран и т.д. В настоящее время на основе Б-ДНКЖ с глутатионом созданы препарат Оксаком, способный купировать приступы гипертонического криза у пациентов, а также высушенный композит Б-ДНКЖ с глутатионом и коллагена, способный резко ускорять заживление кожных ран. При распаде ДНКЖ под действием эндогенных или экзогенных хелаторов железа эти комплексы, продуцируя значительное количество NO, оказывают на клетки и ткани токсическое действие. В частности, это свойство ДНКЖ лежит в основе избирательного губительного действия ДНКЖ с глутатионом на развитие доброкачественных и злокачественных опухолей (соответственно, на эндометриоидные опухоли у крыс и перевивной солидной опухоли Льюис). Тем самым имитируется цитотоксическое действие системы эндогенного NO как эффектора клеточного иммунитета, обнаруживаемого при стационарной концентрации NO 100 и более микроМолей.

Оценка содержания ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в микроорганизмах и тканях животных показала, что в них эти комплексы преимущественно представлены их диамагнитной биядерной формой (Б-ДНКЖ). При этом стационарная концентрация последних близка к стационарной концентрации эндогенно продуцируемого NO. Это совпадение показывает, что NO, продуцируемый в клетках и тканях ферментативным путём при участии соответствующих NO синтаз, может полностью включаться в ДНКЖ. Что касается М-ДНКЖ, они парамагнитны и ЭПР-активны, что и позволило ещё 50 лет назад обнаружить эти комплексы в тканях животных и микроорганизмах по характерному для этих комплексов сигналу ЭПР – сигналу 2,03.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФРАКЦИОНИРОВАННОГО РЕЗЕРВА КРОВОТОКА

Personalized computation of fractional flow reserve

Василевский Ю.В.1,2, Симаков С.С.1,2, Гамилов Т.М.2, Прямоносцев Р.А.1,2

1 – Институт вычислительной математики РАН, 119993, Москва, ул. Губкина, 8;

2 – Московский физико-технический институт, 141700, Долгопрудный, Институтский пер., 9

Тел.: +7(495)984-81-20; факс: +7(495)989-80-23; e-mail: yuri.vassilevski@gmail.com

Атеросклероз коронарных артерий – одно из наиболее распространенных заболеваний, основным методом лечения которого является инвазивное эндоваскулярное вмешательство (стентирование или шунтирование). Современным надежным критерием необходимости установки стента в конкретной части сосудистого русла является фракционированный резерв кровотока (FFR), определяемый как отношение среднего давления ниже стеноза к среднему давлению в аорте, измеренные при вазодилатации коронарных артерий. Применяемые в настоящее время способы измерения FFR являются инвазивными (датчик давления доводится до коронарных артерий) и, следовательно, дорогостоящими. Предлагается неинвазивный метод персонализированной оценки FFR на основе численной модели кровотока в по сети коронарных сосудов, восстановленной по данным КТ и ангиографии.

1. Gamilov T.M., Kopylov F.Yu. et al. / Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling, 2015. V.30(5).

2. Danilov A.A., Ivanov Yu.A. Et al./ International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering, to appear

СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКИ**Free radicals and problems of medical biophysics****Владимиров Ю.А.**

Кафедра медицинский биофизики, Факультет Фундаментальной Медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова

Email: yuvlad@mail.ru

Медицинская биофизика – это наука о физических процессах и явлениях в клетках, тканях и органах человека в нормальном состоянии и при заболеваниях. Главные задачи медицинской биофизики сегодня – изучение физико-химических процессов, лежащих в основе развития болезней человека, разработка новых физических методов, приборов и аппаратов для диагностики и лечения, создание новых лекарств на основе изучения атомной структуры биомолекул и бионаноструктур.

В развитии основных социально-значимых болезней человека ключевую роль играют процессы нарушения функций биологических мембран и генетического аппарата клетки, вызванные свободными радикалами. Основные события в отечественной науке, связанные с выяснением роли свободных радикалов в нормальной жизнедеятельности клеток и развитии болезней человека в нашей стране это: создание кафедры биофизики на Биолого-почвенном факультете МГУ (Б.Н. Тарусов), выяснение роли свободных радикалов в повреждении биологических мембран при действии ионизирующей радиации на человека и животных, выяснение роли радикалов при действии УФ излучения на белки и биологические мембраны, открытие сверхслабой хемилюминесценции при реакциях свободных радикалов в биологических структурах, создание отделения и кафедры на Медико-биологическом факультете 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, выяснение механизма свободнорадикального окисления липидов в биологических мембранах и липопротеинах, разработка на этой основе методов хемилюминесцентного анализа крови и тканей в целях лабораторной клинической диагностики, выяснение роли свободных радикалов и электрического пробоя мембран в нарушении барьерных свойств клеточных мембран, создание теории терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного и светодиодного излучения на организм человека и животных, выяснение роли радикалов и механизма их образования при программированной смерти клеток – апоптозе.

ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ

Electrical signals in higher plants: mechanisms of generation and propagation

Воденев В.А.

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр-т Гагарина, 23

Тел.: +7(831)462-32-15; факс: +7(831)462-32-02; e-mail: v.vodeneev@mail.ru

У высших растений выделяют два типа электрических сигналов – потенциал действия (ПД) и переменный потенциал (ВП). ПД возникает в ответ на неповреждающие воздействия, ВП – при повреждении. Оба типа электрических реакций представляет собой переходную деполяризацию клеток. ПД у высших растений обладает свойствами, характерными для всех живых организмов. В отличие от ПД, ВП проявляет зависимость от интенсивности воздействия, имеет нерегулярную фазу де- и, в особенности, реполяризации, параметры ВП изменяются по мере распространения.

Генерация ПД связана как с возникновением пассивных потоков ионов, так и с изменением активности электрогенного насоса – протонной АТФазы плазматических мембран. Возникновение импульса обусловлено активацией потенциалзависимых кальциевых каналов и входом в клетку Ca^{2+} . Увеличение концентрации Ca^{2+} ведет к активации хлорных каналов и инактивации протонной АТФазы. Выход ионов хлора и диссипация протонного градиента ведут к развитию фазы деполяризации. Формирование фазы реполяризации связано с выходящим калиевым потоком и восстановлением активности протонной АТФазы. В меньшей степени исследован механизм генерации ВП. Доминирующей является точка зрения, согласно которой развитие ВП обусловлено временным угнетением активности электрогенного H^+ -насоса. В то же время, имеются сведения, что вклад в формирование ВП вносят и пассивные потоки ионов кальция, хлора и калия.

Распространение электрических сигналов происходит преимущественно по проводящим пучкам. Несмотря на то, что ВП относят к распространяющимся электрическим сигналам, этот тип электрической реакции представляет локальную реакцию, которая возникает в ответ на химический или гидравлический сигнал.

Электрические сигналы вызывают по ходу распространения кратковременные изменения целого ряда процессов. Выдвинуто предположение, что конечной целью индуцированных электрическими сигналами изменений функционального состояния растения является повышение его неспецифической устойчивости.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (проект №6.2050.2014/К).

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**Stem cells, biophysical control mechanisms of their functioning. Applied aspects**

Волотовский И.Д.1, Межевикина Л.Ф.2, Полешко А.Г.1, Фесенко Е.Е.2

1 – Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220073, Минск, ул. Академическая 27

2 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская 3
Тел.: +375(172)841749; факс: +375(172)842359; e-mail: Volot@basnet.by

Стволовые клетки (СК), привлекают большое внимание как объект биологического исследования и лечебного средства в регенеративной медицине. Основной акцент в исследованиях делается, однако, на прикладных аспектах – использовании СК для лечения заболеваний, а многие вопросы их биологии, в частности, механизмы регуляции пролиферативной активности и жизнеспособности, переключения их потенции на различных этапах эмбриогенеза, остаются непонятными. В работе приводятся данные совместных исследований двух институтов по выяснению механизмов контроля функционального статуса СК в культурах эмбриональных и мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК). С одной стороны, в роли факторов контроля выступают продукты паракринной активности МСК, факторы роста, а с другой, гипоксия, низкое содержание O_2 в среде.

Ростовые факторы LIF (лейкемия-ингибирующий фактор), SCF (фактор стволовых клеток), bFGF (фактор роста фибробластов) регулируют пролиферативную активность СК через модификацию функциональной активности митохондрий, кальциевого обмена и структурного состояния мембран клеток. С активацией клеточной пролиферации сопряжено ингибирование в этих условиях образования активных форм кислорода.

Общеизвестный феномен активации пролиферативной активности СК при гипоксии связан с глубокими структурно-функциональными изменениями на уровне клетки. Проявляется это даже в морфологии культуры клеток, усиливается образование колоний на поверхности монослоя адгезированных на пластике МСК. Отражается это также на таком метаболическом процессе в клетке как обмен порфиринов. При гипоксии в клетках активируется синтез порфиринов, более контрастно это видно при индуцировании порфириногенеза дельта-аминолевулиновой кислотой. При этом, как это следует из анализа протеомных карт, на фоне появления новых белков увеличивается синтез белка HIF1 α (фактор, индуцированный гипоксией) и порфиринового транспортера ABCG2. При блокаде транспортера фумитреморином С наблюдается рост содержания порфиринов внутри клеток и уменьшается их содержание в среде. В клетках растет также содержание активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, гибель клеток. Особым стабилизирующим эффектом обладает bFGF, он частично снимает стимулирующий эффект гипоксии на синтез порфиринов, а белок HIF1 α контролирует скорость клеточного цикла МСК.

Предполагается, что белок ABCG2P играет ключевую роль в системе внутриклеточного контроля функционирования СК. При гипоксии в противоположность обычным атмосферным условиям оптимизируется синтез порфиринов, при избытке которых в клетке начинают проявляться токсические эффекты и их гибель.

Рассматриваются основы клеточных технологий лечения заболеваний человека. Приводятся результаты лечения пациентов с трофическими язвами голени в Институте биофизики НАН. Беларуси, для этого использовались аутологичные МСК, полученных из жировой ткани пациентов.

О РОЛИ СТРУКТУРИРОВАНИЯ ВОДЫ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЖИВОЙ СИСТЕМЫ

On the Role of structuring Water in the Functioning of living system

Галль Л.Н.

Институт аналитического приборостроения РАН, 190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., 26
тел 8(812)251-71-10, E-mail: lngall@yandex.ru

В докладе роль структурирования воды в коллоидном состоянии протоплазмы живой клетки рассматривается на основе физической гипотезы функционирования материи живого организма. Гипотеза предлагает новый подход к описанию принципов организации и функционирования живой системы, в котором эта организация состоит во взаимосвязи химических процессов в молекулярном «каркасе» (веществе) и физических факторов (энергии), управляющих в нем последовательностью межмолекулярных реакций и осуществляющих их синхронизацию. Новый подход основан на фундаментальных моделях физики материи и изложен в виде теории, названной «Физические принципы функционирования материи живого организма» [1,2]. В основу «Принципов» положено представление о материи как идентичности ее вещественного (m) и энергетического (E) состояний, причем все эффекты взаимодействия энергии E (электромагнитного поля) и вещества m по своей физической природе являются одно-квантовыми, но в зависимости от количества одновременно действующих квантов энергии могут формально математически описываться либо как резонансные (одноквантовые) процессы, либо, если идентичных квантов очень много – как процессы полевые. Биополимеры живого организма рассматриваются как молекулярные «энергетические машины», сформировавшиеся в процессе эволюции на основе критерия «кинетического совершенства» [3] и производящие на ангармонизмах своей структуры преобразование распределенной колебательной энергии молекулярных цепей в монокванты энергии (солитоны) [4], характерные для преобразующей молекулы и обеспечивающие протекание ее биохимических взаимодействий с другими молекулами. Вводятся представления о возможности для солитона, движущегося по цепи биополимера, выйти за пределы цепи, если биополимер погружен поляризуемую воду [5]. Важнейшим элементом гипотезы является представление о физическом характере этой поляризации, для описания которой принято данное в [6] представление о способности воды образовывать в объеме своей жидкой фазы фрактальные энергонапряженные кристаллические структуры, время существования которых зависит от поступления к ним энергии, необходимой для их поддержания. Именно такие водные структуры являются магистралями транспортировки квантов энергии между биополимерами в цитоплазме живой клетки, поскольку это движение происходит без их поглощения. Их существование и функционирование обеспечивает процессы управления в живой системе и определяет отличие живого от неживого. Структурирование воды биоактивными молекулами в особые формы, не похожие на ее структурирование неживыми твердотельными объектами, подтверждается многочисленными экспериментами [7,8], а также данными, полученными нами методом L-диэлькометрии.

1. Галль, Л.Н., Физ. принц. функц. материи живого организма, Изд. СПбГПУ, 2014, 400 с.
2. Галль, Л.Н. и Галль, Н.Р., Биофизика, 2009, т. 54, №3, сс. 563-574.
3. Шноль, С.Э., Физико-химические факторы биологич. эволюции, М.: Наука, 2009, 262 с.
4. Давыдов, А.С., Солитоны в молекулярных системах, Киев: Наукова думка, 1988, 304 с.
5. Del Giudice, E., Doglia, S., Milani, M., et al., Nucl. Physics., 1985, B 251, FS 13. pp. 375-400.
6. Бульенков Н.А., Биофизика, 2005, т. 50, №5, сс. 620-664.
7. Бурлакова Е.Б., Рос. Хим. Журнал, 1999, т. 43, №5, с. 3-11.
8. Коновалов А.И., Вестник РАН, 2013, т. 83, №12, сс. 1076-1082.

ЭВОЛЮЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ***Гельфанд М.***

Институт проблем передачи информации РАН

Большое количество секвенированных бактериальных геномов сделало возможным сравнительно изучение регуляторных систем, которое показало их быструю эволюцию. Последнюю при этом можно рассматривать с двух точек зрения: как эволюцию сетей регуляторных взаимодействий и как коэволюцию факторов транскрипции и узнаваемых ими мотивов ДНК. В докладе будут приведены конкретные примеры, а также обсуждены общие проблемы, в частности, поиск правильного языка для описания регуляторной эволюции.

СПЕЦИФИЧНЫЕ ДНК-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТИПОВ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АГЕНТОВ

Specific protein – DNA complexes as targets for design of new types of antiviral drugs

Гурский Г.В.1., Моисеева Е.Д.1, Бажулина Н.П.1, Суровая А.Н.1, Андропова В.Л.2, Никитин А.М.1, Гурский Я.Г.3, Гроховский С.Л.1, Галегов Г.А.2

1 – Институт молекулярной биол. им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва ул. Вавилова, 32

2 – Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16

3 – Кардиологический научно-производственный комплекс, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15 а

E-mail: gursky@eimb.ru

В ходе настоящей работы были синтезированы ДНК-связывающие соединения, которые селективно подавляют развитие вирусного цитопатического эффекта в культуре клеток Vero E6, инфицированных вирусом простого герпеса первого типа. Данные ДНКазного футпринтинга показывают, что эти соединения связываются с А+Т кластером в начале репликации вируса OriS и защищают А+Т кластер от расщепления ДНКазой I. Мы исследовали связывание с ДНК этих соединений с помощью UV и КД спектроскопии, флуоресцентных методов и подвижности комплексов при электрофорезе в геле. В отличие от ацикловира, который является ингибитором вирусной ДНК полимеразы, димерные производные нетропсина ингибируют процесс локального раскручивания ДНК, катализируемый хеликазой UL9 вируса, т.е. действуют на ранней стадии жизненного цикла вируса, когда синтез вирусной ДНК еще не имел места. Резонансный перенос энергии возбуждения по механизму Ферстера (FRET) был использован в качестве метода для исследования структурных изменений, индуцируемых при связывании хеликазы UL9 дуплексом OriS, а также для исследования кинетики хеликазной реакции. В экспериментах использованы олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентные метки, присоединенные к 5'- и 3'-концам олигонуклеотидов в минимальном дуплексе OriS. Показано, что Pt-бис-нетропсин и другие бис-нетропсины уменьшают скорость раскручивания минимального дуплекса OriS хеликазой. Антивирусная активность этих соединений связана с их способностью ингибировать флуктуационное открытие пар оснований в А+Т кластере в OriS. Показано, что хеликаза UL9 индуцирует образование 4-х нитевой структуры Холлидея при взаимодействии с дуплексами, входящими в состав фрагмента OriS ДНК вируса герпеса. Хеликаза также узнает 4-х нитевые структуры Холлидея, образующиеся в растворе при отжиге неспецифических олигонуклеотидов, и связывается менее прочно с двутяжевой и одנותяжевой ДНК. Белок образует три типа комплекса с модельной структурой Холлидея. Комплексы 1 и 2 соответствуют связыванию двух и четырех димеров белка на олигомер ДНК и обнаруживают сходство со связыванием одного и двух тетрамеров белка RuvA *E. coli* со структурой Холлидея в "открытой" форме. Этот конформер присутствует в растворе в отсутствие ионов Mg^{2+} . Он обнаружен также в комплексах с белками, способными узнавать структуру Холлидея в "открытой" конформации. Что касается третьего типа комплекса хеликазы UL9, то он образуется в присутствии ионов Mg^{2+} и, вероятно, соответствует связыванию хеликазы со структурой Холлидея в компактной "стэкинг" X-форме. Мы обнаружили, что если один из двуспиральных участков в структуре Холлидея содержит протяженный одנותяжевый "хвост" на 3'-конце, то хеликаза UL9 катализирует процессинг структуры Холлидея, который усиливается в присутствии 5 мМ АТФ.

Аналогичный подход был нами использован для создания эффективных ингибиторов, подавляющих инициацию синтеза плюс-нити ДНК вируса иммунодефицита человека.

МАЛЫЕ БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА И РЕГУЛЯЦИЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ**Small heat shock proteins and regulation of muscle contraction****Гусев Н.Б.**

Кафедра биохимии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы дом 1

Тел.: +7(495)939-27-47; факс +7(495)939-27-47; e-mail: NBGusev@mail.ru

В организме человека экспрессируется 10 различных малых белков теплового шока (small heat shock proteins, sHsp). Мономеры этих белков содержат от 150 до 250 аминокислотных остатков и имеют консервативную первичную структуру, состоящую из варибельного N-концевого, высоко консервативного кристаллинового и короткого С-концевого доменов. Основной функцией малых белков теплового шока является защита клеток от неблагоприятных воздействий и предотвращение накопления в клетках агрегатов денатурированных белков. Ранее опубликованные данные свидетельствовали о том, что в зависимости от степени фосфорилирования малый белок теплового шока HspB1 способен влиять на кинетику полимеризации актина, а другой малый белков теплового HspB6 в фосфорилированном состоянии способствует расслаблению гладких мышц. Критический анализ данных литературы и собственных экспериментальных результатов позволяет заключить, что вне зависимости от степени фосфорилирования HspB1 не способен взаимодействовать с интактным актином и влиять на его полимеризацию. В то же время HspB1 эффективно предотвращает агрегацию частично денатурированного актина и защищает сократительный аппарат мышц от различных неблагоприятных воздействий. HspB6 также не является истинным актин-связывающим белком, однако фосфорилирование HspB6 сопровождается расслаблением гладких мышц, а фосфорилированный проникающий пептид HspB6 успешно используется для предотвращения контрактуры трансплантатов сосудов. Установлено, что фосфорилированный HspB6 взаимодействует с универсальным адаптерным белком 14-3-3. Высказано предположение, что прочно взаимодействуя с 14-3-3, HspB6 вытесняет других потенциальных внутриклеточных партнеров из их комплексов с 14-3-3. Освободившиеся из этого комплекса фосфатазы, дефосфорилируют кофилин, который после этого оказывается способным индуцировать разборку актиновых филаментов и тем самым способствовать расслаблению гладких мышц. Сделан вывод, что некоторые малые белки теплового шока не только защищают сократительный аппарат от различных неблагоприятных воздействий, но могут опосредованно участвовать в регуляции сократительной активности различных типов мышц.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-00015.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОФИЗИКЕ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

The new directions in biophysics of water ecosystems

Дегерменджи А.Г.

Институт биофизики СОРАН, 660036, Красноярск, Академгородок 50-50

Тел.: +7(391)2431579; факс: +7(391)2433400; e-mail: nn1947@yandex.ru

Возрастающая интенсивность потребления воды быстро приближает время, когда пресная вода станет одним из основных природных ресурсов, «жестко» лимитирующих развитие цивилизации. Уметь прогнозировать экологические последствия деятельности водопользователей, оптимально удовлетворять их потребности – насущные прикладные задачи водной экологии и биофизики водных экосистем (БВЭ). БВЭ представлена тремя основными направлениями со своими собственными физико-математическими методами: мониторинг интегральных параметров экосистем, кинетический экспериментальный подход и математическое моделирование, опирающееся на первые два направления. Классическое развитие БВЭ и методов моделирования имеет ряд почти непреодолимых проблем: бедность **экспериментальных** подходов; объективное множество экосистемных компонент и связей, которые порождают свойство **контринтуитивного** поведения; слабость методов определения трофо-энергетических и регуляторных взаимодействий; отсутствие эффективно действующих **иерархических** принципов организации экосистем. Интенсификация исследований в области БВЭ может базироваться на новых направлениях, изложенных в докладе.

1. Развитие математической теории подобия водных экосистем (ВЭ) послужило бы научной основой для создания принципов переноса лабораторных опытов «на» природные (и обратно(?)). Теория подобия хорошо себя показала в гидродинамике/аэродинамике. В докладе показаны перспективы этого направления и для БВЭ.

2. Поиск лимитирующих факторов должен опираться на принцип аутостабилизации [1] и отклик **ускорения** роста в ответ на возмущение численности популяций.

3. Вместо опоры на список химических веществ в БВЭ может быть более интересный путь новых интегральных оценок состояния ВЭ, по сути своей базирующийся на холистическом подходе в биофизике. К такому направлению относится разработка комплекса так называемых "биотестов", идея и существо которых следующие:

а) каждый биотест является моделью (экспресс-моделью) некоторой целевой биологической функции (организма, популяции), например, дыхание, подвижность, размножение, смертность, мутабельность (мутагенность) и пр.; существенно, что число таких функций и соответственно биотестов должно быть **конечно**; б) финальное конечное число независимых(?) биотестов зависит исключительно от полноты определения биологически значимых целевых функций и не должно увеличиваться с ростом спектра загрязнителей; в) биотесты должны "позволять" выписать для них системы уравнений (по аналогии с моделями типа Ферхюльста-Перла), описывающих их временную специфическую динамику для типичных экосистем (лабораторных и/или полевых); эти уравнения вместе со "входами" в виде "стока биотестов" должны потом использоваться при прогнозе динамик биотестов для ВЭ.

4. Возможность создания элемента иерархической лестницы в цепи "клетка - популяция" может решаться на основе статистического анализа возможных связей между значениями популяционных микропараметров.

Предлагаемые направления могут ускорить решение прикладных вопросов: управление качеством воды через управление структурой ВЭ, экологическая экспертиза ВЭ, управление "цветением" и многие другие.

1. Degermendzhy, A.G., Adamovich, V.A., and Pozdiaev, V.N., Int. J. of Cybernetics and Systems, 1998, vol. 20, pp. 501-541

КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ КАК СТОХАСТИЧЕСКИЕ ДИНАМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**Cell membranes as stochastic dynamic systems: results of computational experiments*****Ефремов Р.Г.1,2***

1 –Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

2 –НИУВысшаяшколаэкономики, 101000, Москва, ул.Мясницкая, 20
e-mail: r-efremov@yandex.ru

Клеточные мембраны выполняют целый ряд специфических и тонко регулируемых функций, которые делают их не только незаменимыми для обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки, но и являются перспективными с точки зрения создания на их основе новых поколений нанобъектов. Функциональная активность биомембран в норме и при патологии определяется особенностями их молекулярного состава, а также степенью и динамикой изменения их физико-химических свойств в различных процессах. Понимание на молекулярном уровне этих взаимосвязей необходимо не только для углубления наших фундаментальных знаний, но и для рационального конструирования мембранных супрамолекулярных систем с заданными свойствами. Одной из нерешенных проблем является недооценка роли эффектов т.н. «мембранного ответа», т.е. активной реакции водно-липидной среды на взаимодействующие с ней внешние агенты, включая пептиды и белки. Мембрану часто рассматривают как инертную гомогенную среду, основное предназначение которой – аккомодация мембранных белков (МБ). Однако результаты недавних экспериментальных и вычислительных работ показывают, что клеточные мембраны являются чрезвычайно динамичными системами, причем их действие сильно зависит от локальных (до ~1 нм) особенностей и флуктуаций их структуры, гидрофобных и электрических свойств и т.д. Для исследования мембранных сред и их влияния на поведение МБ разработан эффективный вычислительный подход к анализу на молекулярном уровне структурно-динамических параметров всех компонентов этих мезоскопических систем –липидов, воды, полипептидов и ионов[1-3]. Установлено что локальные перестройки мембранного окружения играют важную роль при связывании мембрано-активных соединений, вызывая специфическую кластеризацию липидов и инициируя образование дефектов в мембране. Кроме того, на основании результатов расчета свободной энергии спонтанной ассоциации трансмембранных (ТМ) альфа-спиралей впервые показано, что липиды вносят значительный вклад в энергию димеризации, в то время как контакты аминокислотных остатков часто являются невыгодными. Детальный баланс различных энергетических вкладов сильно зависит от состава мембраны и аминокислотной последовательности ТМ сегмента белка. Сделано предположение о том, что процессы ассоциации ТМ спиралей имеют преимущественно энтропийный характер [4].

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00871).

1. Pyrkova, D.V., et al., *Soft Matter*, 2011, vol. 7, pp. 2569-2579.
2. Krylov, N.A., et al., *ACS Nano*, 2013, vol. 7, pp. 9428-9442.
3. Chugunov, A.O., et al., *Scientific Reports*, 2014, vol.4, 7462.
4. Volynsky. P.E., et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 2013, vol.135, pp. 8105-8108.

РОЛЬ ГАМК-ЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ Ca^{2+} -СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, В РЕГУЛЯЦИИ СПОНТАННОЙ СИНХРОННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЗГА

Зинченко В.П., Туровский Е.А., Туровская М.В., Теплов И.Ю., Бережнов А.В., Сапунов Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия, vprz@mail.ru

Формирование нейрональной сети в культуре сопровождается появлением «синхронной» пачечной электрической активности, которая сопровождается синхронными кальциевыми импульсами. ГАМК-ергические нейроны играют важную роль в регуляции возбуждения нейронных сетей мозга. Тормозное действие осуществляется за счет взаимодействия ГАМК с рецепторами клеток-мишеней. Предполагается, что селективная гибель интернейронов или ослабление их ГАМК-секретирующей функции является причиной гиперактивности контролируемых ими популяций нейронов и последующей их гибели при многих нейродегенеративных заболеваниях. Популяция ГАМК-ергических нейронов неоднородна и состоит из нескольких подтипов, имеющих различное функциональное назначение. Отдельные подтипы ГАМК-ергических нейронов содержат Ca^{2+} -связывающие белки (CaBP) в буферных концентрациях. Кроме прямого действия на динамику внутриклеточного кальция CaBP регулируют пачечную активность нейронов, активируя кальций-зависимые калиевые каналы BK и SK типов. Несмотря на очевидную важность ГАМК-ергических нейронов, содержащих CaBP, в регуляции потоков информации в мозге, физиологическая роль CaBP остается под вопросом, а экспериментальные методики для селективной манипуляции с подтипами ГАМК-ергических нейронов ограничены.

Настоящая работа посвящена поиску новых механизмов регуляции ССП нейрональной сети ГАМК-ергическими нейронами, содержащими CaBP. Используя методы анализа изображения, конфокальной микроскопии, цитоиммунохимии, показано, что: (i) одним из механизмов участия ГАМК-ергических нейронов в регуляции ССП является инверсия градиента ионов Cl^- , которая наблюдается в парвальбумин содержащих интернейронах при гипоксии и гиперактивации. Предполагается, что такие нейроны могут выполнять функцию экстренного торможения гипервозбуждения в сети при высокой частоте ССП, используя для своей гиперактивации инвертирование градиента Cl^- ; (iii) CaBP регулируют синхронность, форму и длительность импульсов, фильтрацию низких частот ССП как непосредственно за счет Ca^{2+} -буферных свойств, так и за счет активации кальций-зависимых калиевых каналов SK и BK типов. Заполнение внутриклеточного буфера Ca^{2+} при высокой частоте колебаний приводит к увеличению степени синхронности Ca^{2+} пульсаций; (iiii) обнаружена популяция быстрых ГАМК-ергических нейронов, содержащих пресинаптические Ca^{2+} -проводящие каинатные рецепторы без десенситизации, активация которых глутаматом приводит к сильному торможению ССП во всех популяциях нейронов. Таким образом, ГАМК-ергические нейроны, содержащие CaBP, используют различные механизмы для контроля возбудимости и синхронной активности нейрональной сети.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С**Physicochemical mechanisms of regulation of oxidative stress by hepatitis C virus*****Иванов А.В., Смирнова О.А., Иванова О.Н., Кочетков С.Н.***

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: aivanov@yandex.ru

Вирус гепатита С (ВГС) является широко распространенным и опасным патогеном человека. Вызываемое им заболевание сопровождается развитием хронического воспаления и фиброза печени, а также разнообразные метаболические нарушения, часто приводящие к появлению цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. В последние годы появились лекарственные препараты для излечения хронического гепатита С, однако их распространение сильно ограничено крайне высокой стоимостью. Наконец, даже излечение пациента не снижает риск развития патологий до стандартного уровня. Соответственно, исследование механизмов патогенеза вируса остается крайне актуальным.

Одним из механизмов развития патологий печени при хроническом гепатите С является окислительный стресс, возникающий в инфицированных гепатоцитах. Однако литературные данные о механизмах его возникновения были крайне ограничены. В основном такие работы сводились к описанию дисфункции митохондрий в инфицированных клетках или клетках, экспрессирующих белок капсида вируса. Кроме того, практически отсутствовала информация о роли активных форм кислорода (АФК) в жизненном цикле вируса.

Нами было показано, что основными белками вируса, вызывающими повышение уровня АФК в клетках гепатокарциномы Huh7 являются белки капсида и, в меньшей степени, NS5A. Экспрессия белка капсида приводила к нарушению редокс-баланса гепатоцитов вследствие усиления выработки пероксида водорода и супероксид-аниона. Было найдено, что основными источниками супероксид-аниона являлись НАДФН-оксидазы 1 и 4, цитохром P450 2E1 и система окислительного фосфорилирования митохондрий. Основные источники H₂O₂ находились вне митохондрий. В их число входили оксидоредуктин эндоплазматического ретикулума 1 α (Ero1 α) и белки катаболизма биогенных полиаминов, активация всех этих источников происходила на уровне транскрипции генов. Наконец, гиперэкспрессия Ero1 α вызывала и нарушение гомеостаза ионов кальция, что и приводило к дисфункции митохондрий. Аналогичное исследование механизмов для белка NS5A подтвердило вклад НАДФН-оксидаз и цитохрома в возникновение окислительного стресса. В то же время было установлено, что вопреки устоявшемуся мнению, нарушение белком NS5A гомеостаза Ca²⁺ не вносит существенного вклада в появление окислительного стресса.

Кроме того, нами было найдено, что белки капсида и NS5A активируют и систему защиты от окислительного стресса, регулируемую Nrf2/ARE каскадом. Изучение этого явления показало, что оба белка вируса активируют фактор транскрипции Nrf2 не только по каноническому АФК-зависимому, но и не описанному ранее АФК-независимому механизмам.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 14-14-01021).

ЧТО ТАКОЕ МЫШЛЕНИЕ И СОЗНАНИЕ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФИЗИКИ ?

WHAT thinking and consciousness means from the physical point of view?

Иваницкий Г.Р.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Мышление и сознание – это свойство новой коры мозга и одно из средств повышения устойчивости существования организмов в окружающем мире. Архитектоника новой коры – это комбинация двух квазикристаллических трехмерных структур с разной плотностью и с разными характеристическими временами работы. Первый кристалл – сравнительно плотная и быстро реагирующая на приход сигналов из внешней среды решетка нейронных сетей. Вторым кристаллом – глиальная сеть, т.е. межклеточное пространство (МП) в нейронной сети, заполненное плазмой крови, липидами, ионами, сахарами и нейромодуляторами. МП деформируется частотой сокращений сердца и изменением поля трансмембранных потенциалов нейронов. *Паттерны деформации МП являются кратковременной памятью.* Время жизни паттернов зависит от вязкости МП. Работу новой коры можно описать взаимодействием законов классической механики (поставкой кинетической энергии за счет сокращений сердца) с квантовой механикой (использованием части этой кинетической энергии в дискретной нейронной сети). Скорость обработки информации связана с иерархией элементов, запоминающих её. Она зависит от двух параметров – скорости комбинаторного перебора при поиске информации в различных блоках памяти и блочно-иерархической организации памяти. Блочно-иерархический поиск объясняет большую скорость обработки информации и реакций организма при сравнительно низкой скорости нервных возбуждений. Волны возбуждения, распространяющиеся в МП, нельзя отнести ни к одному классу волн, поскольку они в зависимости от частоты работы сердца и импульсов возбуждения нейронов проявляют различные свойства, т.е. при столкновении могут аннигилировать, интерферировать и проходить друг сквозь друга. Эти волны являются *новым классом волн с кросс-диффузией.* Будет показана динамика различных паттернов, образуемых этими волнами, и объяснены парадоксы, известные в нейронауках (парадокс сжатия времени и парадокс Павлова-Лешли).

1. Tsyganov M.A., Ivanitsky G.R., Biktashev V.N. *Running tails as codimension two quasi-solitons in excitation taxis waves with negative refractoriness.* // Chaos, Solitons and Fractals..40, p.2271-2276 (2009.).
2. Цыганов М.А., Бикташев В.Н., Бриндли Дж., Холден А.В., Иваницкий Г.Р. *Волны в кросс-диффузионных системах – особый класс нелинейных волн* // Успехи физических наук, , т.177, № 3, с.275-300 (2007).
3. Tsyganov M.A., Ivanitsky G.R. and Zemskov E.P. / *Wave reflection in a reaction-diffusion system: Breathing patterns and attenuation of the echo.* // Phys. Rev. E., 89, 052907, p. 1–9 (2014).
4. Иваницкий Г.Р. *XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики* // Успехи физических наук. 180(4), с. 337-369 (2010)
5. Цыганов М.А., Иваницкий Г.Р. / *Солитоноподобный и несолитонный режимы взаимодействия таксисных волн (на примере бактериальных популяционных волн)* // Биофизика, , т.51, №6, С.1008-1013 (2006).
6. Борисюк Г.Н., Борисюк Р.Н., Казанович Я.Б., Иваницкий Г.Р. *Модели динамики нейронной активности при обработке информации мозгом – итоги "десятилетия"* // Успехи физических наук, , т.172, №10, с.1189-1214 (2002).
7. Иваницкий Г.Р., Медвинский А.Б., Цыганов М.А. *От динамики популяционных автоволн, формируемых живыми клетками, к нейроинформатике.* // Успехи физических наук, , т.164, №10, с.1041-1072 (1994).
8. Иваницкий Г.Р. *Выражи закономерностей. Правило БИО – стержень науки.* М.: Наука, (2011).

ЭВОЛЮЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ**Evolution of genetic regulatory systems: computer analysis, modeling, and experiments****Колчанов Н.А.**

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск

Основателем сибирской школы генетики, академиком Д.К. Беляевым (директор ИЦиГ СО РАН с 1959 до 1985 г.) был инициирован один из наиболее интересных экспериментов по изучению генетических основ одомашнивания животных, олицетворяющий новый концептуальный подход к анализу эволюционных проблем и воспроизводящий в эксперименте исторический процесс одомашнивания. Объектом экспериментальной одомашнивания была выбрана лисица как близкий родственник самого первого домашнего животного, собаки, наиболее ярко демонстрирующей все эволюционные последствия одомашнивания. Отбором была создана совершенно уникальная популяция одомашненных лисиц, у которой нет аналогов в мире: в кратчайшие сроки (десятки лет) удалось воспроизвести длительный (~ 10 000 лет) исторический процесс генетической трансформации поведения диких животных в сторону одомашнивания. Продемонстрированы комплексные молекулярно-генетические, нейроэндокринные и онтогенетические механизмы эволюционных изменений лисиц в условиях систематического отбора на социальную толерантность к человеку. Принципиально то, что параллельно с генетическим преобразованием поведения в процессе отбора лисиц на одомашнивание возникали морфологические изменения, гомологичные имеющимся у многих исторически одомашнированных животных, являющиеся «маркерами одомашнивания». К их числу относятся изменения краниального и осевого скелета, общего характера пигментации, специфически локализованная депигментация шерстного покрова, вислоухость, свернутый в кольцо хвост. Физиологические изменения обнаружены в серотониновой медиаторной системе мозга и в гипофизарно-надпочечниковой системе стресса. В ходе анализа молекулярно-генетической природы процессов экспериментальной одомашнивания, выявлено изменение в активности многих генов, вовлекаемых в регуляцию развития и функционирования нервной системы. На мейотической карте генома лисицы был идентифицирован регион (на 12-й хромосоме), наиболее тесно ассоциированный с ручным поведением. Принципиальное значение этого результата усиливается тем, что он оказался гомологичным региону на 5-й хромосоме собак, который интерпретируют как регион, ответственный за раннюю одомашнивание волка и его эволюционный переход в примитивную собаку. Экспериментальное одомашнивание лисиц повышает активность генов рецептора ацетилхолина CHRNA2 и фермента, разрушающего ацетилхолин, ACHЕ, в тканях мозга. Известно, что эти гены влияют на когнитивное поведение и увеличением их активности у одомашненных лисиц можно объяснить более успешное решение ими когнитивных задач, связанных с взаимодействием с человеком. Изменение активности гена ДНК-метилтрансферазы может указывать на вовлечение в процесс одомашнивания механизмов эпигенетической регуляции. Уникальные селекционные модели одомашнивания были созданы в ИЦиГ СО РАН не только на лисице, но также на норке и на серой крысе. В результате одомашнивающей селекции норка возникла генетическая линия животных, лишенная агрессии по отношению к человеку. Путем селекции диких серых крыс по поведению были получены генетические линии агрессивных и одомашнированных животных, причем одомашнированные крысы существенно более успешно решали когнитивные задачи при позиционировании крыс в новую среду обитания. Подавление агрессивности у ручных крыс связано со значительным увеличением числа глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, что является причиной усиления отрицательной об-

ратной связи со стороны гормонов коры надпочечника и подавления как стрессовых реакций, так и агрессивного поведения.

Механизмы процессов доместикационной селекции были проанализированы методами биоинформатики с привлечением теории генных сетей и функционирования регуляторных контуров. Значимость этих исследований исключительно велика также потому, что они открывают возможности принципиально нового взгляда на становление психофизиологических и поведенческих особенностей человека, возникших в результате процесса самодоместикации, важнейшей особенностью которого являлся естественный отбор по поведенческим характеристикам.

БИОФОТОНИКА СИНГЛЕТНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА**Biophotonics of singlet molecular oxygen*****Красновский А.А. 1,2***

1- Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп. 33, к.2, РФ

2 – Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899, Ленинские горы, РФ

Тел.: +7(495)954-14-72; e-mail: phoal@mail.ru.

Молекулярный кислород принадлежит к соединениям, играющим исключительно важную роль в биосфере. С одной стороны, кислородные молекулы определяют энергетику живых систем, так как участвуют в процессах фотосинтеза и дыхания, с другой служат источником активных форм, которые являются причиной окислительного стресса. Кроме того, кислородные молекулы проявляют свойства, характерные для органических хромофоров. Они обладают полосами поглощения в УФ, видимой и ИК области спектра, принадлежащих главным образом триплет-синглетным переходам в молекулах O_2 , излучают флуоресценцию и фосфоресценцию, способны акцептировать энергию от соответствующих доноров и передавать энергию соответствующим хромофорам. Долгое время вопросы фотоники кислорода были предметом физики атмосферы и далеких от биологии разделов спектроскопии газов при высоком давлении или в сжиженном и твердом состояниях при низкой температуре. Началом биофотоники кислорода послужило открытие 40 лет назад фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода (СК) в пигментных растворах в естественных условиях [1]. В докладе предполагается кратко рассмотреть основные результаты пяти многолетних проектов нашей группы и инициированных ими проектов других лабораторий: (1) спектральные и кинетические параметры фотосенсибилизированной люминесценции СК при стационарном и импульсном лазерном возбуждении; (2) кинетические параметры СК в органических, водных и биологических системах; (3) радиационное время жизни СК; (4) фотосенсибилизированная люминесценция димолей СК и сенсibilизированная двумя молекулами СК флуоресценция красителей; (5) фотохимическое исследование абсорбционных свойств молекулярного кислорода, основанное на его прямом (беспигментном) лазерном возбуждении. Основное содержание этих проектов изложено в обзорных статьях автора [2-4], а также в цитированных в них экспериментальных исследованиях. В настоящее время представления биофотоники кислорода служат основой для понимания особенностей его электронной структуры и характера взаимодействия с окружением, фундаментальных проблем фотобиологии и фотомедицины, а также для практических целей фотодинамической и лазерной терапии.

1. Красновский, А.А., Биофизика, 1976, т. 21, сс. 748-749.
2. Krasnovsky, A.A., in Photodynamic therapy at the cellular level, Uzdensky, A.B., Ed., 2007, pp. 17-62, Research Signpost, Trivandrum-695 023, Kerala, India.
3. Krasnovsky, A.A., J. Photochem. Photobiol.: A: Chem., 2008, vol. 196, pp. 210-218.
4. Красновский, А.А., в монографии Фундаментальные науки – медицина. Биофизические медицинские технологии, под ред. Григорьев, А.И. и Владимиров, Ю.А., М.: Макс Пресс, 2015, т. 1, сс. 173-217.

ПТЕРИНЫ КАК УЧАСТНИКИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Pterins as a participant of photobiological processes

Крицкий М.С., Буглак А.А., Вечтомова Ю.Л., Людникова Т.А., Телегина Т.А.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр.2
Тел. +7(495) 952-34-31; факс: +7(495)954-27-32; e-mail: mkritsky@inbi.ras.ru

Птерины (2-амино-4-оксо-птеридина) известны в биохимии в качестве ключевых коферментов темного метаболизма. Это, в первую очередь, семейство коферментных производных фолиевой кислоты, а также представитель так называемых неконъюгированных птеринов – тетрагидробиоптерин (кофактор NO-синтаз и монооксигеназ-гидроксилаз ароматических аминокислот). Молекулы птеринов служат мишенями воздействия ультрафиолета UV-A и UV-B в организмах. Одно из таких производных, 5,10-метенил-тетрагидрофолат, функционирует в качестве хромофора-светосборщика в ДНК-фотолиазах и криптохромах, причем это соединение, по-видимому, не является единственным птерином, функционирующим в белках-фоторецепторах. По существу, речь идет о пополнении списка распространенных в организмах хромофоров – рецепторов фотона еще одним классом химических соединений.

Возникает вопрос: какие свойства того или иного птеринового производного могли повлиять на его конкурентоспособность в процессе отбора молекул на роль рецептора фотонов в белках? Попутно напрашивается и другой вопрос: является ли функция пигмента-светосборщика единственно пригодной для птеринов или же соединения этой группы, как и другие производные птеридина – флавины, могут служить участниками фотохимических циклов переноса электрона и протона в реакционных (каталитических) центрах белков? Одной из предпосылок для ответа на эти вопросы служит сравнительный анализ фотохимических свойств различных структурных разновидностей и редокс форм биологических птеринов.

Исходя из этих соображений, наша группа проводит исследование фотохимических реакций с участием возбужденных молекул птеринов. В докладе будут представлены результаты анализа продуктов реакций и кинетики фотохимических реакций, развивающихся при возбуждении птеринов, принадлежащих к разным структурным группам, т.е., производных фолиевой кислоты, а также биоптерина и его восстановленных форм – тетрагидро- и дигидробиоптерина.

Познание фотохимических свойств птеринов перспективно также и в плане биомедицинских исследований, не имеющих прямого отношения к проблеме физиологической рецепции фотона организмами. Суть проблемы заключается в том, что УФ-возбуждение птеринов, в том числе, коферментов, может индуцировать фотохимические процессы с патологическими последствиями. Примером служит анализ путей воздействия УФ-излучения на тетрагидробиоптерин-зависимый процесс меланогенеза, нарушение которого лежит в основе развития дерматологического заболевания витилиго.

Поддержано ПФИ № 28 РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы».

ПЕРЕНОС ЗАРЯДА В ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛАХ ДНК. НАНОБИОЭЛЕКТРОНИКА**Energy and charge transfer in the single DNA molecule. Nanobioelectronics****Лакно В.Д.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт математических проблем биологии Российской академии наук, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д.4

lak@impb.psn.ru

Показано, что в холстейновской молекулярной цепочке, помещенной в сильное продольное электрическое поле возможно образование новых типов возбужденных состояний. В случае синтетической однородной полинуклеотидной цепочки такие возбуждения могут распространяться на большое расстояние (более, чем 1000 нуклеотидных пар) вдоль цепочки, приближенно сохраняя свою форму. Возбуждения формируются только в случаях когда поле приложено или очень быстро включается сразу после того, как выполнены специальные начальные условия. Такие возбуждения могут переносить заряд даже в случае, когда холстейновские поляроны обладают очень малой подвижностью. Полученные результаты применяются для однородных PolyG / PolyC дуплексов и могут служить основой для объяснения известных экспериментов Финка и Шоненберга по переносу заряда в ДНК на большое расстояние.

На основе модели Пейрарда-Бишопа-Доксуа рассматриваются также нелинейные возбуждения в ДНК, вызванные приложенной к молекуле внешней силой. Показано, что внешнее воздействие может приводить к образованию пузырей, которые могут распространяться вдоль молекулы.

Рассматривается взаимодействие избыточных электронов и дырок с пузырями. Численные эксперименты демонстрируют возможность переноса заряда пузырями на большое расстояние. Обсуждаются возможные приложения полученных результатов в нанобиоэлектронике.

Работа поддержана грантом РФФИ, проект №1307 – 00256.

РОЛЬ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ В ФОРМИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНОСТИ ТКАНЕЙ

Transcription Regulation in Formation of Tissue Identity

Воронцов И.Е.1,2, Кулаковский И.В.1,2, Makeev В.Ю.1,2,3

1 – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3;

2 – Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

3 — Московский физико-технический институт (университет), Долгопрудный, Московская обл., Институтский пер., д. 9.

e-mail: vsevolod.makeev@gmail.com

Формирование индивидуальных типов клеток происходит в результате дифференцировки тканей в процессе индивидуального развития и в конечном счете сводится к формированию набора генов, специфически активных в данном типе клеток. Активность конкретных генов определяется разными биологическими процессами, в частности связыванием белков – факторов регуляции транскрипции вблизи активируемых промоторов. В рамках проекта FANTOM впервые были получены профили активности промоторов для большого количества тканей. Эти профили позволяют оценить разнообразие экспрессии генов в разных тканях и определить промоторы, активные в конкретных группах образцов. Очень часто нуклеотидные последовательности в окрестности совместно активируемых промоторов содержат сходные мотивы. Детальный анализ выборок последовательностей, расположенных в окрестностях промоторов со сходной картиной активности в разных тканях, позволил выявить несколько сотен мотивов, большинство из которых оказалось уже известными мотивами, специфически связывающими факторы регуляции транскрипции. Очень часто рядом с промоторами, активными в конкретных типах тканей, обнаруживались мотивы, связывающие факторы, функционально активные именно в клетках этих типов (например, HNF1, HNF4 и NR4A1 в гепатоцитах). Кроме того было найдено несколько десятков новых мотивов, не похожих на известные мотивы, специфически связывающие конкретные транскрипционные факторы. В целом можно заключить, что примерно для половины из 1500 известных факторов транскрипции имеется информация о специфическом мотиве связывания этих факторов, а часто и данные о роли этого фактора в регуляции экспрессии конкретных тканеспецифических генов. В докладе описана классификация транскрипционных факторов и их мотивов, и особенности расположения мотивов, связывающих конкретные факторы, вблизи активных промоторов.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ НЕРВНОГО ВОЛОКНА**Biophysical aspects of nerve fibers demyelination**

Максимов Г.В., Вердиян Е.Э., Родионова Н.Н.

Биологический факультет МГУ имени Ломоносова, Москва

Известно, что высокая скорость проведения потенциала действия (ПД) в миелиновых нервных волокнах поддерживается за счет сальтаторного, т.е. скачкообразного распространения ПД от одного перехвата Ранвье к другому [Tasaki, 1955]. Ранее миелин отводил исключительно роль изолятора биологических токов. В последнее время все больше работ, свидетельствующих о том, что состояние миелина в процессе генерации и проведения ПД далеко не пассивно и регулируется за счет взаимодействий между аксоном и Шванновской клеткой. Известно, что в области перехвата локализованы потенциал-зависимые Na^+ -каналы, в то время как K^+ -каналы в данной области почти отсутствуют [Chiu, Ritchie, 1980; Caldwell et al., 2000]. Наоборот, под миелином сконцентрировано большое количество K^+ -каналов [Sherer, Arroyo, 2002; Poliak, Peles, 2003; Koenig, 2009]

В данной работе исследовали действие ряда агентов, модифицирующих состояние экстраклеточных участков белков нервного волокна (проназа Е, пара-хлормеркурибензоат, нитропруссид, блокатор K^+ -каналов тетраэтиламмоний) на возбудимость и состояние липидов миелина, моделируя первичные акты процесса демиелинизации [Roper, Schwarz 1989; Carratu et al. 1998].

Установлено, что инкубация миелинового нервного волокна с проназой Е, которая приводит к изменению структуры экстраклеточных участков белков аксо-глиального комплекса за счет гидролиза пептидных связей, а также с донором NO, который модифицирует гидрофобную фазу белков и липидов, существенно снижает амплитуду ПД. Уменьшение амплитуды ПД при блокировании SH-групп белков аксо-глиального комплекса при действии пХМБ наблюдается значительно позже, только на 40 минуте инкубации. Важно, что блокирование проведения ПД сопровождается параллельными изменениями доли “связанной” воды в компартментах волокна. Итак, изменения первичной структуры экстраклеточных участков белков аксо-глиального комплекса за счет гидролиза пептидных связей повышает долю “связанной” воды, а изменение вторичной структуры (конформации) экстраклеточных участков белков при блокировании SH-групп - к уменьшению доли “связанной” воды. Вероятно, изменение состояния экстраклеточных белков и, в первую очередь, межклеточных белков периаксонального пространства под миелином меняет долю свободной и связанной воды за счет перераспределения заряженных и гидрофобных участков. Показано, что инкубация волокон с проназой Е, в отличие от пХМБ, приводит к изменению упорядоченности жирнокислотных “хвостов” липидов миелина. Известно, что NO регулирует аксо-глиальные взаимодействия нервного волокна [Atkins et al. 1999] и, соответственно, меняет вязкость миелина. В наших экспериментах действие NO увеличивало упорядоченность ЖК-остатков ФЛ, а также снижало уровень “связанной” воды миелина. Вероятно, NO вызывает изменение упорядоченности ЖК-остатков ФЛ миелина не только посредством нитрозилирования SH-групп белков и активации ПОЛ, но и за счет изменения количества мембраносвязанного Ca^{2+} , активируя K^+ -каналы. Блок активности K^+ -каналов как в области перехвата Ранвье, так и под миелином приводит к увеличению упорядоченности ЖК-остатков ФЛ миелина и уменьшению уровня “связанной” воды в компартментах миелина.

ХАОС В ДИНАМИКЕ ПОПУЛЯЦИЙ: МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ И РЕАЛЬНОСТЬ

Chaos in population dynamics: mathematical models and reality

Медвинский А.Б., Нуриева Н.И., Русаков А.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(909)900-54-38; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: medvinsky@iteb.ru,

alexander_medvinsky@yahoo.com

Популяции во многих случаях характеризуются значительными нерегулярными флуктуациями их численности во времени [1]. Проблема возникновения таких флуктуаций, зачастую рассматривающихся как проявление динамического хаоса [2], до сих пор остаётся нерешённой. Примечательно в связи с этим, что анализ результатов многочисленных полевых наблюдений за колебаниями численности популяций позволили сформулировать предположение о том, что, в отличие от результатов, полученных в ходе математического моделирования (см., например, [3]), преобладающее число реальных популяций обитает на краю хаоса, т.е. на границе между хаотической и регулярной динамикой [4].

В данной работе мы на основании анализа данных, полученных в ходе полевых наблюдений, показываем, что планктонные сообщества в Нарочанских озёрах (Белоруссия) демонстрируют хаотическое поведение вдали от края хаоса. А именно, применяя численный рекуррентный анализ [5], мы показываем, что горизонт предсказуемости динамики планктона Нарочанских озёр близок к 2,5 месяцам, что позволяет [6] сделать оценку доминантного показателя Ляпунова, численное значение которого оказывается близким к +0,4. Такое значение показателя Ляпунова лежит вне узкого интервала между -0,1 и + 0,1, характерного для жизни на краю хаоса [4]. Кроме того, с помощью численного рекуррентного анализа [5] мы выявили, что численные значения энтропии Реньи второго порядка, характерные для динамики как фитопланктона, так и зоопланктона Нарочанских озёр, во многих случаях существенно превышают величины соответствующих доминантных показателей Ляпунова. Это означает, что динамика планктона Нарочанских озёр характеризуется по крайней мере двумя степенями свободы. Следовательно, численное описание хаотических колебаний численности планктонных популяций в этом случае может потребовать четырёх- или более размерного фазового пространства [7]. Вместе с тем, не исключено, что гетерогенность среды обитания способна нивелировать проявления хаоса [8].

1. Фёдоров, В.Д. и Гильманов, Т.Г., Экология, Москва: Издательство Московского университета.
2. Ott, E., Chaos in Dynamical Systems, Cambridge: Cambridge University Press.
3. Medvinsky, A.B., Petrovskii, S.V., Tikhonova, I.A., Malchow, H., and Li, B.-L., SIAM Review, 2002, vol. 44, pp. 311-370.
4. Turchin, P., Complex Population Dynamics. A Theoretical/Empirical Synthesis, Princeton: Princeton University Press.
5. Marwan, N., Romano, M.C., Thiel, M., and Kurths, J., Physics Reports, 2007, vol. 438, pp. 237-329.
6. Boffetta, G., Cencini, M., Falcioni, M., and Vulpiani, A., Physics Reports, 2002, vol. 356, pp. 367-474.
7. Takens, F., Lecture Notes in Mathematics, 1981, vol. 898, pp. 336-381.
8. Medvinsky, A.B., Bobyrev, A.E., Burmensky, V.A., Kriksunov, E.A., Nurieva, N.I., and Rusakov, A.V., Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling, 2015, vol. 30, pp. 55-70.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАНОАЭРОЗОЛИ: АНАЛИЗ, ГЕНЕРАЦИЯ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**Biological Nanoaerosols: Analysis, Generation, Use**

В.Н. Морозов 1,3**, *И.Л. Канев 1*, *А.Ю. Михеев 1*, *Е.А. Шляпникова 1*, *Ю.М. Шляпников 1*, *Т.Я. Морозова 1*, *А.О. Нвабуэзе 2,3*, *К.Н. Линдبلاد 2,3*, *М.А. Владимирский 4*, *М.Л. ван Хок 2,3
1 – Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, г. Пущино Московской обл.
2 – Факультет системной биологии университета Джорджа Майсона, Манассас, Вирджиния
3 – Национальный Центр Биозащиты и Инфекционных Заболеваний университета Дж. Майсона, Манассас, Вирджиния 20110; 4 – НИИ фтизиопульмонологии им. И.М. Сеченова, Москва,
E/mail: vmorozov@gmu.edu

Представлены последние разработки лаборатории Наноструктур и Нанотехнологий Института Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН. В сотрудничестве с другими организациями в лаборатории разрабатываются методы анализа биологических аэрозолей, способы генерации биологических наноаэрозолей и проводятся их испытания как новой лекарственной формы. Основные разделы лекции: Аналитические наночастицы как средство анализа биологических микро- и наноаэрозолей [1]. Разработана новая технология электроформования слоев полимерных нановолокон, отличающаяся тем, что в ней не применяется проводящая подложка, а формируется свободный наномат с использованием газофазной нейтрализации заряженных нановолокон. Показано, что такие наноматы значительно превосходят по фильтрующим свойствам все известные фильтрующие материалы, позволяя быстро собирать аэрозоли из большого объема воздуха в малый объем жидкой пробы для дальнейшего биохимического анализа. Продемонстрировано успешное применение таких фильтров для анализа нозокомальных инфекций. Пробы аэрозолей, собранные в палатах туберкулезной клиники и проанализированные методом ПЦР показали наличие ДНК микобактерий в воздухе палат, в которых присутствовали больные с активной формой туберкулеза. Разработанные методы могут быть применены для анализа других инфекций, передающихся воздушным путем на транспорте, в общественных зданиях и на предприятиях. Аналитические фильтры испытываются в лаборатории также как средство сбора проб легочной жидкости в выдыхаемом воздухе. Разработана технология генерации наноаэрозолей биологических веществ, основанная на электрогидродинамическом распылении растворов с последующей газофазной нейтрализацией продуктов распыления [2]. Исследованы факторы, способные повредить распыляемые биологические молекулы, найдены условия, при которых распыление происходит без изменения структуры и функциональных свойств белков [3] и других биологических и биологически-активных веществ, таких как антибиотики. Разработаны лабораторные прототипы приборов-генераторов биологических наноаэрозолей, устройства для мониторинга качества наноаэрозоля и определения дозы лекарства, осажденного в легких. Такие генераторы позволяют переводить в наноаэрозольную форму любое вещество, растворимое в воде или в спирте, генерировать стабильный наноаэрозоль в течение нескольких часов. Прототипы приборов были испытаны при лечении легочной инфекции у лабораторных животных. Показано, что вдыхание наноаэрозолей антибиотика - левофлоксацина мышами, инфицированными легочной формой туляремии, излечивает животных при дозах (мг/кг), значительно меньших чем при пероральном введении того же антибиотика. Наноаэрозоль левофлоксацина, заключенного в нанолипосомы, терапевтически значительно активней, чем наноаэрозоль чистого антибиотика.

1. Mikheev, A.Y., Kanev, I.L., Morozova, T.Ya., and Morozov, V.N., J. Membr. Sci., 2013, vol. 448, pp. 151-159.
2. Morozov, V.N., Kanev, I.L., Mikheev, A.Y., et al., J. Aerosol Sci., 2014, vol. 69, pp. 48-61.
- Kanev, I.L., Mikheev, A.Y., Shlyapnikov, Y.M., Shlyapnikova, E.A., and Morozov, V.N., Anal. Chem., 2014, vol. 86, pp. 1511-1517.

ДАЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ПРИНЦИПЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО УЗНАВАНИЯ НА РАЗНЫХ УРОВНЯХ СТРОЕНИЯ БИОСИСТЕМ

Long-range interactions and principles of molecular recognition at the different levels of a structure of biosystems

Намиот В.А.1, Батяновский А.В.2, Филатов И.В.3, Туманян В.Г.4, Есипова Н.Г.4

1 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт ядерной физики, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 1

2 – Институт биофизики клетки и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27

3 – Московский физико-технический институт, 141700, Институтский пер., 9, Московская обл., г. Долгопрудный

4 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Структурообразование включает в себя ряд процессов, среди которых один из важнейших – соединение различных участков синтезируемой системы между собой в единую конструкцию. Однако сложно ответить на вопрос, каким образом готовые к дальнейшему структурообразованию участки находят друг друга? Этого можно достичь, если в составе участков есть выделенные области для непосредственного узнавания. Нужно, чтобы эти области близко подошли друг к другу. Эксперименты показывают, что процессы идут значительно быстрее, чем время, требуемое для перебора вариантов. Следовательно, наряду с контактным взаимодействием, должно существовать и дальнедействующее распознавание.

С одной стороны, расстояния между взаимодействующими объектами не должно быть слишком малыми. С другой стороны, чтобы избежать всевозможных ошибок такое дальнедействующее взаимодействие должно быть достаточно селективным. Как мы показали, возможна ситуация, когда эти два требования могут быть выполнены одновременно, в том числе в биологических макромолекулах, которые включают в себя большое число спиральных участков, а дальнедействующее взаимодействие таких участков имеет определённую специфику. Поскольку «диаметр» таких молекул много меньше их длины, то может возникнуть ситуация, когда расстояния ними, с одной стороны, много больше их «диаметра», что позволяет им свободно двигаться, но, с другой стороны, много меньше их длины, что приводит к появлению селективности. Разработанные аналитические подходы позволили оценить параметры процессов узнавания. Если распределение зарядов в спиральных участках не имеет совпадающих периодов, то энергия взаимодействия близка к нулю. Но если узнающие структуры имеют совпадающие периоды, то потенциал взаимодействия существенно возрастает, причём характерный масштаб убывания этого потенциала определяется величиной совпадающего периода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты 14-04-90034-Бел_а и 15-04-99605а.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ДНК КАК МЕХАНОХИМИЧЕСКОЕ ЯВЛЕНИЕ**DNA cleavage as mechanochemical phenomenon**

Нечипуренко Д.Ю.1, Ильичева И.А.2, Попцова М.С.1, Нечипуренко Ю.Д.2, Полозов Р.В.3, Гроховский С.Л.2

1—МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1

2—Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;

3—Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, г. Пущино Московской обл.

Тел.: +7(495)939-30-25; e-mail: ne4ipur@gmail.com

В основе регуляции генетической экспрессии лежит взаимодействие белков с определенными сайтами молекулы ДНК. Специфичность таких взаимодействий обусловлена локальными структурными неоднородностями ДНК. За последние годы накоплено множество теоретических и экспериментальных данных о структурных неоднородностях ДНК и их зависимости от последовательности нуклеотидов. Один из подходов к изучению структурных неоднородностей ДНК основан на явлении специфичного расщепления ДНК под действием ультразвука [1]. Анализ электрофоретических картин расщепления и их зависимости от условий проведения эксперимента свидетельствует о механохимическом характере разрыва молекул [2,3]. Показано, что наблюдаемая неоднородность расщепления ДНК под действием ультразвука может быть связана с особенностями конформационной динамики циклов дезоксирибозы в составе молекулы. Анализ данных о расщеплении ДНК различными методами в процессе подготовки проб для секвенирования (NGS) показал, что специфичность расщепления ДНК при использовании не ферментативных методов фрагментации носит универсальный характер и соответствует наблюдаемой специфичности расщепления ДНК под действием ультразвука [4].

1. Гроховский, С.Л., Ильичева, И.А., Нечипуренко, Д.Ю., Панченко, Л.А., Полозов, Р.В., и Нечипуренко, Ю.Д., Локальные неоднородности структуры и динамики двухспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука, *Биофизика*, 2008, т. 53, сс. 417-425.
2. Grokhovsky, S.L., Il'icheva, I.A., Nechipurenko, D.Yu., Golovkin, M.V., Panchenko, L.A., Polozov, R.V., and Nechipurenko, Yu. D., Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA, *Biophysical Journal*, 2011, vol. 100, pp. 117-125.
3. Нечипуренко, Д.Ю., Ильичева, И.А., Ходыков, М.В., Попцова, М.С., Нечипуренко, Ю.Д., и Гроховский, С.Л. Моделирование механохимического расщепления ДНК под действием ультразвука, *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 6, сс. 1061-1070.
4. Poptsova, M.S., Il'icheva, I.A., Nechipurenko, D.Y., Panchenko, L.A., Khodikov, M.V., Oparina, N.Y., Polozov, R.V., Nechipurenko, Y.D., and Grokhovsky, S.L., Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing, *Sci. Rep.*, 2014, vol. 4, p. 4532.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Mass spectrometry methods for investigation of biological macro molecules and theirs complexes

Николаев Е.Н.1,2,3, Попов И.А.2,3

1 – Сколковский институт науки и технологий, 143026, Москва, Территория Инновационного Центра “Сколково”, улица Нобеля, д. 3;

2 – Московский физико-технический институт, 141700, Московская область, г. Долгопрудный, институтский переулок, д. 9;

3 – Институт энергетических проблем химической физики РАН, 119334, г. Москва, Ленинский проспект, д. 38, корп. 2.

Тел.: +7(499)137-82-58; факс: +7(499)137-82-58; e-mail: ennikolaev@gmail.com

Благодаря революционным открытиям и разработкам, сделанным в области ионизации биологических макромолекул на рубеже XX и XXI веков, масс-спектрометрия стала распространенным методом исследований в области биохимии, биофизики, молекулярной биологии и медицины. Бурное развитие техники и новых методов позволило достичь выдающихся аналитических характеристик масс-спектрометрических методов исследования биологических макромолекул: точности измерения массы (на уровне ppb), разрешающей способности (больше 10⁷), динамического диапазона концентраций исследуемых смесей (до 10⁶), порога детектирования (на уровне 10-12 М).

В докладе проводится анализ некоторых подходов к исследованию структуры биологических макромолекул и их комплексов с использованием возможностей современных методов фрагментации биомолекул.

Возможности методов структурного анализа иллюстрируются на примере успешно решенных задач исследования изомеризации молекул бета-амилоида, его комплексов с металлами и низкомолекулярными соединениями.

Востребованными являются масс-спектрометрические методы экспресс-анализа физиологических жидкостей и тканей, использующие ионизацию в атмосферных условиях без пробоподготовки (т.н. прямая масс-спектрометрия). В докладе дается обзор таких методов ионизации, основанных на микроэкстракции биологических макромолекул непосредственно из пробы с одновременной ионизацией и переводом в газовую фазу, и приводятся примеры реализации на образцах крови, выдыхаемого воздуха, а также на образцах тканей человека, получаемых при хирургических операциях.

КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ**Calcium binding proteins: structure, properties, functions****Пермяков Е.А.**

Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская 7

Тел.: +7(095)924-57-49; факс: +7(0967)33-05-22; e-mail: epermyak@yandex.ru

Кальций играет важнейшую роль в регуляции большинства фундаментальных биологических процессов [1, 2]. Полное термодинамическое описание процесса связывания катионов металлов белком требует рассмотрения равновесий между нативными свернутыми и развернутыми металл-насыщенными и свободными от металла формами белка. Это позволяет построить фазовые диаграммы состояний белка в координатах температура – концентрация свободного катиона металла. Одним из наиболее изученных семейств Ca-связывающих белков является семейство белков EF-руки (EF-hand). Обнаружено, что EF-hand домен стабилизируется двумя структурными мотивами, расположенными вне Ca-связывающих областей: двумя кластерами, расположенными на противоположных концах антипараллельной β -структуры. В кластере I, составленном из ароматических АК остатков, почти полностью отсутствуют дестабилизирующие взаимодействия. В кластере II, составленном из АК остатков разного типа, мало стабилизирующих взаимодействий, но есть дестабилизирующие взаимодействия. Обнаружено, что механизм теплового разворачивания парвальбминов переключается связыванием ионов металлов и меняется от полного отсутствия теплового перехода первого рода (апо-состояние) до одного или двух переходов типа «все или ничего» с наличием промежуточного состояния. Показано что окисление парвальбумина активными формами кислорода зависит от конформации белка и Mg^{2+} -насыщенный парвальбумин обладает такой же антиоксидантной емкостью, как и апо-белок, что позволяет полагать, что одной из функций парвальбумина является защита клеток от разрушающего действия активных форм кислорода. Обнаружено, что α -N-ацетилирование существенно стабилизирует структуру отдельных парвальбуминов, изменяет их равновесные и кинетические параметры связывания металлов, придает устойчивость к олигомеризации и воздействию протеаз. Методами молекулярной динамики показано, что при диссоциации димера белка S100P на мономеры спирали в пучке спиралей каждого мономера вращаются так, чтобы защитить экспонирующиеся растворителю неполярные группы, при этом почти все потерянные контакты на поверхности раздела димера замещаются эквивалентными новыми взаимодействиями, образуются новые стабилизирующие взаимодействия и функциональное гидрофобное ядро. Предсказано существование возможных нативно разупорядоченных областей в белках S100. Для распознавания белков-мишеней важны АК остатки как в упорядоченных, так и «неупорядоченных» областях. Единственным мономерным белком семейства S100 является белок S100G. Показано, что апо-S100G обладает более рыхлой структурой по сравнению с Ca^{2+} -насыщенным состоянием, которая, однако, не развернута и плавится кооперативно. Причиной высокой стабильности апо-S100G может быть сильное взаимодействие между его N- и C-концевыми частями, содержащими EF-hand домены I и II, соответственно.

1. Пермяков, Е.А., Металлсвязывающие белки: структура, свойства, функции, М.: Научный мир, 2012. Permyakov, E.A. and Kretsinger, R.H., Calcium binding proteins, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ВОДОЕМОВ

Biophysical approach to the definition of pond primary production

Погосян С.И.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, д.1,
стр. 12

e-mail: pogosyan@biophys.msu.ru

Первичная продукция является одной из основных характеристик любого водоема в силу того, что обеспечивает органическим веществом все последующие трофические цепи водной экосистемы. Определение первичной продукции традиционными методами (по выделению кислорода, по включению в состав органического вещества радиоактивного изотопа углерода и др.) сопряжено с большими методическими трудностями и ошибками. Кроме того, эти определения проводят эпизодически на взятых из водоема пробах воды. Традиционные методы способны обнаруживать только очень большие изменения первичной продукции водоема и не позволяют выявить длительные тренды в изменениях трофности водоема.

Ранее на кафедре биофизики биологического факультета МГУ были разработаны методы и аппаратура для определения обилия и функционального состояния фитопланктона. Были созданы зонды для определения распределения и состояния фитопланктона во всей водной толще, проточные системы для определения состояния фитопланктона по ходу судна и станции непрерывного автоматического мониторинга фитопланктона.

Достижения в исследовании механизмов фотосинтеза, накопленный опыт в создании методов определения обилия фотосинтезирующих организмов и их функционального состояния позволяют разработать новые подходы к определению первичной продукции в пресноводных и морских акваториях. Методической основой для реализации данного подхода является вычисление потока электронов, проходящих через фотосистему 2, при естественной подводной облученности путем измерения параметров флуоресценции хлорофилла в составе фитопланктона и спектральных измерений подводной облученности. Предполагается размещение измерительной аппаратуры на буйковой станции, имеющей кабельную связь с береговой лабораторией. Информация о продукционном процессе должна поступать на береговую лабораторию в режиме реального времени автоматически по соответствующей программе.

Обсуждаются как теоретические, так и практические трудности в реализации предлагаемого подхода для определения первичной продукции в водоеме.

ВОЗМОЖНОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ЛАЗЕРНЫХ ПИНЦЕТОВ В РЕШЕНИИ ЗАДАЧ БИОФИЗИКИ**Possibilities of laser tweezers technology for the solution of biophysical problems*****Приезжев А.В.1,2, Ли Кисун1***

1 – Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1;

2 – Международный учебно-научный лазерный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1;

Тел.: +7(495)939-26-12; факс: +7(495)939-31-13; e-mail: avp2@mail.ru

Лазерные пинцеты (ЛП), также называемые оптическими ловушками, представляют собой новую технологию, которая возникла в середине 1970-х годов. Появление этой технологии открыло новые возможности для манипулирования без механического контакта микрочастицами различной природы и измерения сил взаимодействия между ними и с окружающей средой на уровне межмолекулярных и межклеточных взаимодействий (пикоНьютоны). Из-за чрезвычайно широкой области возможных применений этой технологии она получила интенсивное развитие и многие исследовательские группы разных стран мира приняли участие в разработке как новых схем и режимов работы ЛП, так и разнообразных применений.

В основе механизма действия ЛП лежит изменение момента сил, действующих на диэлектрическую частицу при рефракции на ней остро сфокусированного или как-то иначе сформированного пучка света с сильно выраженным пространственным градиентом интенсивности. ЛП формируются пучками лазерного излучения с длиной волны, лежащей вне полос поглощения захватываемыми частицами (в случае биологических частиц - в ближнем ИК диапазоне). Источниками излучения могут быть как непрерывные диодные лазеры или твердотельные лазеры с диодной накачкой, так и импульсные лазеры с высокой частотой повторения импульсов, например, фемтосекундные лазеры. Основное требование к лазерным пучкам состоит в высоком качестве профиля распределения интенсивности. Чаще всего используются гауссовы пучки, однако для специальных применений используют также пучки с более сложными профилями, например, бесселевые. Для формирования многоканальных ЛП используются акустооптические модуляторы или другие устройства.

ЛП используются для исследования широкого спектра проблем биофизики, например, механизмов функционирования молекулярных моторов, отвечающих за подвижность клеток, изменение их формы и за внутриклеточный транспорт. Только применение ЛП позволило измерить силы и динамику молекулярных моторов на уровне одиночных молекул, продвинуться в понимании стохастической природы их функционирования. Разработаны также методы практического использования ЛП для сортировки клеток по различным признакам, для измерения вязкости и упругости гелей и биополимеров. Манипуляция живыми клетками, захваченными с помощью ЛП, лежит в основе практически важных методов искусственного оплодотворения и модификации эмбрионов.

В докладе представлены последние результаты, полученные с помощью ЛП, созданного нами для исследования биофизики взаимодействия живых клеток, в частности, при агрегации эритроцитов (АЭ). АЭ – это фундаментальный обратимый процесс регулирования гидродинамического сопротивления сосудистой сети движению крови, механизмы которого остаются до конца не понятыми. Изменение АЭ тесно связано с развитием большинства важнейших заболеваний. Нами измерены силы взаимодействия клеток при агрегации и дезагрегации, в зависимости от состава окружающей среды, температуры, площади и длительности первоначального контакта, характерные для крови здоровых доноров и пациентов, страдающих разными заболеваниями. Презентация сопровождается показом видеозаписей процессов взаимодействия клеток при их агрегации/деагрегации в режиме реального времени.

КИНЕТИЧЕСКИЕ, МОНТЕ-КАРЛО И МНОГОЧАСТИЧНЫЕ МОДЕЛИ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА

Kinetic, Monte-Carlo and multiparticle simulation of primary photosynthetic processes

Ризниченко Г.Ю., Беляева Н.Е., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Маслаков А.С., Плюснина Т.Ю., Устинин Д.М., Хрущев С.С., Рубин А.Б.

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы д.1, стр. 12, Москва 119992
тел. (495)9390289 e-mail: riznich@biophys.msu.ru

В докладе представлены результаты работ по моделированию первичных процессов фотосинтеза, выполненные на кафедре биофизики биологического факультета МГУ. Кинетические модели процессов в фотосинтетической мембране представляют собой системы дифференциальных уравнений для вероятностей состояний мультиферментных комплексов фотосинтетических реакционных центров ФС1 и ФС2 и описывают также процессы, связанные с генерацией трансмембранного электрохимического потенциала. Монте-Карло модели моделируют последовательность индивидуальных элементарных стадий переноса электрона в ансамблях из нескольких миллионов электрон-транспортных цепей, количество которых сравнимо с реальным числом электрон-транспортных цепей в клетке микроводорослей. Многочастичные компьютерные модели описывают процессы на модельной «сцене», включающей собственно мембрану, стромальное и люминальное пространство, и сконструированной в соответствии со структурными данными об организации фотосинтетической мембраны. В модели отдельные молекулы фотосинтетических белков движутся в компартаментах люмена и стромы в соответствии с законами Броуновской динамики, взаимно ориентируются в электрическом поле и образуют комплексы, в которых осуществляется перенос зарядов. Данный метод использован нами при моделировании образования комплексов в растворе и в интерьере тилакоидной мембраны для фотосинтетического белка пластоцианина с цитохромом *f*, фотосистемой 1, цитохромным комплексом; ферредоксина с фотосистемой 1, ферредоксин-НАДФ-редуктазой, гидрогеназой. Кинетические и многочастичные модели используются для оценки параметров фотосинтетической цепи в различных условиях эксперимента (режим выращивания, стрессы, ингибиторы) и для изучения физических механизмов регуляции фотосинтетического электронного транспорта и других процессов трансформации энергии при фотосинтезе.

1. Ризниченко, Г.Ю., Беляева, Н.Е., и др., Кинетические и многочастичные модели фотосинтетического электронного транспорта, в кн. Современные проблемы фотосинтеза, т. 2, под ред. Алахвердова, С.И., Рубина, А.Б. и Шувалова, В.А., М-Ижевск: Изд. ИКИ, 2014, сс.41-100.
2. Rubin, A.B. and Riznichenko, G. Yu, Mathematical biophysics, Springer, 2013, p. 274.

ДИНАМИКА И ЭНЕРГЕТИКА ВНУТРИНЕЙРОННОГО ТРАНСПОРТА**Dynamics and energetics of intraneuronal transport****Романовский Ю.М.**

МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

e-mail: yuromanovsky.yandex.ru

Мозг человека насчитывает до 100 млрд нейронов. Из 10^{26} молекул АТФ, вырабатываемых в сутки, 1/3 потребляется мозгом. Нейрон коры головного мозга тратит на поддержание потенциала покоя 20% энергии, запасенной в молекулах АТФ, а на потенциалы действия – 21%, на синаптические процессы – около 50 %. На потребности молекулярных моторов расходуется около 5%.

В докладе представлены базовые модели шагающих молекулярных моторов: кинезина (К), миозина V (MV) и динеина (Д). Они представляют собой систему двух связанных уравнений типа ФитцХью-Нагумо, работающих в триггерном режиме. Полиномы, описывающие силовые моменты, близки к N-образной форме. Параметры моделей определяются из функциональных схем моторов, построенных на основе экспериментов с применением рентгеноструктурного анализа, криогенной электронной микроскопии, лазерных пинцетов и скоростных методов видеомикроскопии с использованием «квантовых точек» (меток). Другое представление моделей дается в виде систем обобщенных уравнений Релея [4].

В нейронах К шагает по тубулиновым микротрубочкам (МТ) (при этом «башмаки» его ног попеременно связываются с активными центрами (АЦ) на МТ, расположенными друг от друга на расстоянии 8 нм) по направлению от ядра нейрона. Д шагает в обратном направлении. MV шагает по актиновым филаментам. Актиновые филаменты образуют сеть «проселочных дорог» и обеспечивают транспорт в самих синаптических окончаниях. К переносят везикулы с нейромедиаторами, митохондриями, а Д осуществляют «ретроградный» транспорт. Движущий момент определяется силами сорбции молекул АТФ, проникающих в результате диффузии в АЦ моторов. В К (так же, как и в F1АТФазе [1,3]) моменты, порождаемые силами сорбции, непосредственно передаются на исполнительные устройства и приводят к продвижению грузов с преодолением стокового сопротивления. Характерный размер груза-митохондрии порядка мкм, а размеры моторов – десятки нм.

В MV энергия, запасенная в АЦ, сначала трансформируется в энергию деформации, которая реализуется лишь при условии контакта передней ноги с АЦ филамента и при выходе продуктов гидролиза АТФ из АЦ. Функционирование Д осуществляется примерно по такой же схеме, как и MV. Однако, Д более сложная и не до конца исследованная конструкция. Его "ноги" шагают по параллельным канальцам МТ. В «ноге» происходит запасание энергии не только в ее изгибе, но и в ее скручивании. Поэтому Д может перескакивать на соседние канальцы, делать боковые шаги. Заметим, что миозины работают и в коллективе в саркомерах мышц. Энергия АТФ расходуется этими моторами, в основном, на продвижение груза против сил трения и на выдергивание задней ноги из АЦ МТ или филамента актина [2,5]. Результаты моделирования широко иллюстрированы и хорошо соответствуют данным экспериментов. Обсуждаются нерешенные проблемы. Список ссылок содержит около ста названий.

1. Романовский, Ю.М. и Тихонов, А.Н., УФН, 2010, т. 180, сс. 931-956.
2. Kikkawa, M., J. Cell Biol., 2013, vol. 202, pp. 15-23.
3. Romanovsky, Yu.M., Kargovsky, A.V., and Ebeling, W., Eur. Phys. J., 2013, vol. 222, pp. 2465-2479.
4. Лаврова, А.И., Постников, Е.Б., и Романовский Ю.М., УФН, 2009, т. 179, сс. 1327-1332.
5. Трифоненков, В.П. и Карговский, А.В., Компьютерные исследования и моделирование, 2014, т. 6, сс. 747-760.

АДАПТИВНЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ В ЦИТОТЕХНОЛОГИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Adaptive biomaterials in cytotechnology and tissue engineering

Рочев Ю.А. 1,2,3

1 -Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, ул. Институтская, 3, Пущино, Московская обл., Россия;

2- Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

3- National University of Ireland, Galway, Ireland.

e.mail: yury.rochev@nuigalway.ie

В последние годы традиционная парадигма науки о биоматериалах, как о материалах с необходимыми механическими характеристиками и не вызывающих негативного ответа организма, претерпела серьезные изменения. Наиболее перспективными являются материалы, способные адекватно менять свои характеристики при изменении окружающей среды (в англоязычной литературе их называют “smart” или “intelligent”). Для создания такого рода биоматериалов необходимо привлекать новые физические модели, использовать нетрадиционные для биологии и медицины концепции переработки информации и трансформации энергии. Среди адаптивных биоматериалов, повидимому, наиболее перспективными являются полимеры, резко меняющие конформацию при незначительном изменении внешних параметров, таких как pH, температура, концентрация лиганда и т.д. Физико-химические характеристики таких полимеров изучены достаточно подробно, в частности исследовано поведение полимеров с нижней критической температурой растворимости (НКТР). При понижении температуры на несколько градусов ниже критической такие полимеры в водном растворе переходят из состояния компактной глобулы в состояние клубка. В случае полимерных сеток (гелей) переход характеризуется гидратацией, набуханием и увеличением физических размеров гидрогеля. Биологические объекты, например, клетки млекопитающих, иммобилизованные на термочувствительном покрытии при физиологической температуре 37 °С могут успешно функционировать на поверхности термочувствительного материала, однако при понижении температуры ниже НКТР и последующем набухании гидрогеля, происходит открепление биообъектов с поверхности геля. Физический процесс отделения клеток с поверхности набухшего гидрогеля лег в основу новой методологии при работе с клеточными культурами человека и млекопитающих.

Метод культуры клеток является фундаментом современной биологии и медицины. Успехи молекулярной биологии, промышленной биотехнологии, молекулярной фармакологии и тканевой инженерии непосредственно связаны с методом культуры клеток. Задача отделения клеток с поверхностей, на которых иммобилизованы клетки млекопитающих, с неизбежностью возникает, как при масштабном культивировании клеток для производства биологически активных соединений, так и на микро и наноуровнях, при решении проблем, связанных с микрофлюидикой, молекулярной диагностикой, тканевой инженерии т.д. Современные методы открепления клеток с поверхности, основанные на применении специальных ферментов, были разработаны почти столетие назад и с тех пор остаются практически неизменными. На сегодняшний день приведено немало данных, свидетельствующих о принципиальных проблемах связанных с применением ферментов при снятии клеточных культур, поэтому появление новых материалов, изделий из этих материалов, позволяющих как поддерживать рост клеток, так и снимать клетки при понижении температуры на несколько градусов вызвало огромный интерес как среди биологов, так и среди специалистов в области биоматериалов.

НОВЫЕ МЕТОДЫ ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕЙ СУБДИФРАКЦИОННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ**New methods of super resolution subdiffrational fluorescencet microscopy*****Савицкий А.П.1, Лапшин Г.Д.1, Винокуров Л.М.2, Ивашина Т.В.3***

1 – Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2)

2 – Филиал Института Биоорганической Химии имени Академиком М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской Академии Наук, г. Пущино, Россия (142290 Московская обл. г.Пущино, проспект Науки,б)

3 – Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская область, г. Пущино, Россия (142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, дом 5

Последнее десятилетие ознаменовалось быстрым ростом методов сверхразрешающей флуоресцентной микроскопии живых клеток. Это позволяет перевести молекулярный имидж на новый биохимический уровень решения задач пространственно-временного распределения молекулярных и клеточных процессов, учитывающих сложность и индивидуальность одной отдельной живой клетки. Фотопереключаемые цветные флуоресцирующие сыграли исключительно важную роль в разработке методов сверхразрешающей флуоресцентной микроскопии, позволяющей достигать оптического разрешения 20 нм. В настоящее время продолжается работа по поиску и оптимизации свойств фотопереключаемых цветных белков для целей субдифракционной микроскопии в реальном времени.

Мы проанализировали большую группу кораллов и обнаружили, что каждый коралл содержит несколько полос флуоресценции охватывающих почти весь видимого спектрального диапазона. Мы обнаружили, что различия в флуоресценции коралл в некоторых случаях может быть объяснено фотоконверсией цветных белков. Таким образом, разнообразие флуоресцентных полос в кораллах может определяться как одновременным присутствием различных генов, так и за счет фото преобразования. Наше исследование показывает, что такие фотоконвертируемые белки могут быть гораздо более распространенным в кораллах, чем предполагалось ранее. Дикие типы флуоресцирующих белков из кораллов как правило склонны к агрегации. Нами разработана стратегия рационального дизайна мономерных белков с использованием стадий химической модификации олигомерных белков и масс-спектрометрической идентификации ключевых аминокислот отвечающих за агрегацию. С помощью метода направленного мутагенеза был получен мономер белка за счет единичной мутации с сохранением свойств фотоконверсии. Однако при этом скорости фотоконверсии и фотовыцветания значительно варьировались в зависимости от типа мутации, что создает благоприятные условия для оптимизации протоколов для субдифракционной микроскопии.

ОСОБЕННОСТИ ПРОНИКНОВЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ И ЯДРА РАКОВЫХ КЛЕТОК НАНОЧАСТИЦ ПОЛИПЛЕКСОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ

**Features of penetration of polyplex nanoparticles, used for delivery of therapeutic genes,
into tumor tissues and the nuclei of cancer cells**

Соболев А.С.1,2, Дурыманов М.О.1, Розенкранц А.А.1,2

1 – Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

2 – Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 119191, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр.12

Тел. +7(499) 135-31-00, факс: +7(499) 135-41-05, e-mail: sobolev@igb.ac.ru

В докладе на примерах полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-содержащих полиплексов – самособирающихся наночастиц из полимеров и ДНК – анализируются особенности их транспорта из сосудов в ткани и в ядра раковых клеток-мишеней. Рассмотрены несколько типов полиплексов, в том числе содержащие лиганд к сверхэкспрессированным рецепторам на клетках мишенях для придания полиплексам клеточной специфичности (таргетные полиплексы) и не содержащие таковых (нетаргетные полиплексы) [1,2]. С использованием накожной камеры и прижизненной микроскопии было исследовано появление в сосудах опухоли и проникновение в окружающие ткани полиплексов, меченных квантовыми точками. Показано, что в раковой опухоли полиплексы проникают за 4 часа после внутривенного введения на глубину до 20 мкм от границы капилляра, тогда как в нормальной ткани – не более чем на 3 мкм, причем в 400 раз меньшей концентрации. Показано, что таргетные полиплексы более эффективно трансфицируют опухоли, чем нетаргетные. Анализируются возможные пути увеличения глубины проникновения полиплексов и сравниваются некоторые из них по своей эффективности. Таргетные и нетаргетные полиплексы проникают в клетки по различным механизмам, скорости процессов их внутриклеточного транспорта различаются, как различается – также в пользу таргетных полиплексов – и эффективность экспрессии в клетках доставляемых генов. Изучение на отдельных клетках связи клеточного цикла с экспрессией доставленных в них полиплексами генов методом неповреждающей прижизненной микроскопии позволило обнаружить, что полиплексы способны трансфицировать главным образом те клетки, которые прошли митоз вскоре после добавления полиплексов. Совокупность полученных результатов приводит к мнению, что применение полиплексов особенно целесообразно для целей генотерапии злокачественных опухолей, содержащих интенсивно делящиеся раковые клетки.

1. Durymanov, M.O., Slastnikova, T.A., et al., *Biomaterials*, 2013, vol. 34, pp. 10209-10216.

2. Durymanov, M.O., Rosenkranz, A.A., and Sobolev, A.S., *Theranostics*, 2015, vol. 5, pp. 1007-1020.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА BAR**Molecular bases for modeling of cellular membrane by BAR-family proteins****Соколова О.С.**

МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-57-38; факс: +7(495)939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Актинсвязывающие белки, ассоциированные с плазматической мембраной, модифицируют ее, вызывая образование филоподий. Этот процесс контролируют так называемые BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) домены, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами (PIP₂) в составе мембраны. Мутации в генах, кодирующих BAR-домены, могут приводить к различным нервным и аутоиммунным заболеваниям.

Мы использовали электронную микроскопию макромолекул и молекулярное моделирование для изучения конформационных изменений белка Nwk, относящегося к субсемейству F-BAR. Исследовали ориентацию на мембране полноразмерного белка Nwk, а также его N-концевого F-BAR домена. В норме Nwk формирует зигзагообразные паттерны на мембране, содержащей 10% PIP₂. При экспериментальной замене концевых лизинов в позициях 181-184 на нейтральные лейцины, а также при уменьшении содержания PIP₂ в мембране, паттерны изменяются и белок формирует прямые тяжи. Это свидетельствует о значимости терминальных остатков F-BAR и липидного состава для образования мембранных выступов.

Мы также получили трехмерные структуры полноразмерного Nwk на мембране и в растворе. С использованием моделирования по гомологии были построены модели доменов F-BAR и SH3. Модели были встроены в электронную плотность для интерпретации полученных результатов. Был сделан вывод, что белок автоингибируется С-концевыми SH3 доменами и при взаимодействии с мембраной его конформация значительно изменяется. Наши данные позволяют предположить новый механизм автоингибирования Nwk.

Работа поддержана грантом РФФ (№14-14-00234).

1. Иванов, А.А., Петров, В.В., и др., Биофизика, 1998, т. 1, сс. 2-3.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИОКАРДА: ОТ КЛЕТКИ ДО ОРГАНА

Cardiac modeling: from cell to organ

Соловьева О.Э.1,2

1 – Институт иммунологии и физиологии (ИИФ) УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул.

2 – Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

Тел./факс: +7(343)362-34-58; e-mail: soloveva.olga@urfu.ru

*Памяти члена-корреспондента РАН
Владимира Семеновича Мархасина
(23.04.1941-11.04.2015)*

Миокард – сложно организованная система, интегрирующая биофизические процессы на различных уровнях организации – от молекулярно-клеточного до целого органа. Функциональные следствия прямых и обратных связей между этими процессами и их роль в регуляции функции сердечной мышцы сложно оценить без помощи математического моделирования. В докладе будут приведены примеры, иллюстрирующие применение математических моделей не только для описания и понимания сложных процессов, но и для предсказания новых явлений в сердечной мышце. В частности, будут обсуждена роль кооперативных механизмов кальциевой активации в регуляции функции кардиомиоцитов. Математические модели предсказывают, что эти механизмы оказываются универсальными в объяснении ряда биофизических феноменов в сердечной мышце: законе Франка-Старлинга и феномене Анрепа, сердечной механо-электрической связи [1]. Эти механизмы могут также играть существенную роль в нарушении функции миокарда при действии патологических факторов. Например, при перегрузке кардиомиоцитов кальцием, сопровождающей ряд заболеваний сердечной мышцы, кооперативные механизмы влияния механической активности на кальциевую динамику в клетках могут либо облегчать, либо предотвращать возникновение сердечных аритмий [2]. Прогностические возможности математического моделирования будут продемонстрированы на результатах исследования феномена неоднородности миокарда. Эффективная биофизическая модель неоднородной ткани в виде мышечного дуплета, механически объединяющего два сегмента сердечной мышцы с разными свойствами, была реализована и исследована и теоретически, и в физиологическом эксперименте [3]. В этом случае математическое моделирование позволило предсказать новый класс явлений, которые затем были зарегистрированы в целенаправленных биофизических экспериментах. Новые перспективы математического моделирования в кардиологии открываются в связи с созданием детализированных трехмерных моделей сердца, учитывающих сложную архитектуру миокарда (геометрию и ход волокон) и особенности функциональных свойств кардиомиоцитов. В настоящее время развитие математических моделей органного уровня позволяет ставить задачу построения персонифицированных моделей, которые в обозримом будущем должны стать неотъемлемой частью «Р4» медицины (предсказательной, превентивной, персонифицированной и партнерской). Будут представлены важные для клиники результаты, демонстрирующие влияние формы левого желудочка сердца человека на его электрическую [4] и механическую функцию. Работа поддержана грантом РФФИ №14-35-00005, РФФИ 14-01-00885.

1. Solovyova, O., Vikulova, N., et al., J. Bifurc. Chaos, 2003, vol. 13, pp. 3757-3782.
2. Katsnelson, L.B., Solovyova, O., et al., Progress in biophys. and molec. biol., 2011, vol. 107, pp. 81-9.
3. Solovyova, O., Katsnelson, L.B., et al., Progress in biophys. and molec. biol., 2014, vol. 115, pp. 115-28.
4. Pravdin, S., Dierckx, H., et al., BioMed. Research International, 2015, in press.

ХИРАЛЬНОСТЬ КАК СИСТЕМНЫЙ ФАКТОР СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Chirality as the system factor of structure formation in molecular biology

Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2
e-mail: tverdislov@mail.ru

Продолжено развитие концепции, согласно которой иерархическое структурообразование в информационно детерминированных макромолекулах (нуклеиновых кислотах и белках) непосредственно связано с гомохиральностью первичной структуры, а инструментом стратификации в них служит знакопеременное чередование “правых” (D) и “левых” (L) субмолекулярных структур [1].

Ранее нами была выявлена синергетическая закономерность, которая, имеет общий физико-химический и биологический смысл. Эволюционирующая система, обладающая запасом свободной энергии и хиральной асимметрией, способна в процессе самоорганизации изменять тип симметрии внутри одного иерархического уровня, повышая свою «сложность», а при переходе на более высокий уровень – изменять масштаб и знак хиральности со сменой функциональной роли энантиоморфа. В иерархию макромолекулярных структур “вмонтирован” принцип разделения уровней, механизм которого базируется на смене знака хиральности. Первичная структура гомохиральна по асимметричному углероду, а, начиная со вторичной структуры, хиральность связана с образами спиральности. Для белков в качестве первичной структуры мы рассматриваем цепочку аминокислотных остатков, а для ДНК – молекул дезоксирибозы, а не нуклеотидов, как принято.

Пептидная цепь белков, составленная из L-аминокислотных остатков, как правило, сворачивается в правые α -спирали, которые, в свою очередь, скручиваются преимущественно в двойные левые суперспирали. Смена знака хиральности наблюдается и при переходе на уровень четвертичных структур, что можно проследить на примере белков сократительных систем. В типичной структуре ДНК на гомополимер D-дезоксирибоз “нанизаны” нуклеиновые основания в левой гош-конфигурации, что позволяет затем сформировать правую двойную спираль, которая, в свою очередь, может свернуться в левую кольцевую суперспираль (у бактерий). Частные отклонения от данной системы не изменяют общей тенденции.

Мы полагаем, что знакопеременные хиральные последовательности структурных уровней D-L-D-L и L-D-L-D для ДНК и белков, соответственно, определяют конформационную траекторию, которая направляет фолдинг макромолекул в ловушку Левинтала, задавая одновременно структурно-функциональную дискретность уровней. Значимое для фолдинга чередование знака хиральности имеет термодинамическое объяснение: таким способом система понижает свободную энергию, увеличивая уровень энтропии. Подобный иерархически сформированный “хиральный каркас” макромолекул позволяет им функционировать как молекулярным машинам с выделенными поступательными и вращательными механическими степенями свободы. Циклически функционирующие молекулярные машины, с необходимостью, сами являются хиральными объектами.

1. Твердислов, В.А., Биофизика, 2013, т. 58, №1, сс. 159-164.

РЕАКЦИИ КЛЕТОК НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ: СИГНАЛЬНЫЕ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

The reactions of cells to photodynamic impact: signaling and epigenetic mechanisms

Узденский А. Б.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского. Южный федеральный университет (ЮФУ), г. Ростов-на-Дону, 344090 Россия
Т. +7(863)-243-31-11; E-mail: auzd@yandex.ru

На примере фотодинамического (ФД) эффекта рассматриваются реакции клеток на повреждающие воздействия и процессы, регулирующие выживаемость и смерть клеток. Как инициируются и регулируются клеточные реакции, направленные на защиту клетки или ее смерть? Где граница между живой и неживой клеткой? Возможно ли возвращение поврежденной клетки в нормальное состояние? Эти вопросы ставились в классических работах Р.Вирхова, Д.Н.Насонова и В.Я. Александрова и многих других. По современным представлениям, не только нормальная жизнедеятельность, но и основные формы клеточной смерти – некроз, апоптоз и аутофагия - управляются сложной системой сигнальной трансдукции и эпигенетической регуляции, состоящей из десятков тысяч белков. Это позволило сформулировать задачу управлять жизненными функциями и смертью клеток, модулируя сигнальные и эпигенетические процессы. Для понимания интегральных механизмов клеточных реакций необходима детальная информация о составе и динамике работы множества взаимодействующих компонентов системы внутриклеточной сигнализации. Сведения об одновременных изменениях экспрессии сотен и тысяч генов и концентраций соответствующих белков могут дать современные методы геномики и протеомики. ФД воздействие, вызывающее интенсивный окислительный стресс и смерть клеток, применяется в онкологии для разрушения опухолей. Первичные механизмы его, связанные с генерацией синглетного кислорода, хорошо известны, но роль сигнальной и эпигенетической регуляции в фотоповреждении и защите разных типов клеток изучена недостаточно. Пока трудно предсказать судьбу клетки при том или ином воздействии – выживание, изменение функциональной активности, некроз или апоптоз. С помощью ингибиторов или активаторов сигнальных белков нами изучены механизмы регуляции ФД-индуцированного некроза и апоптоза изолированных нейронов и глиальных клеток. По этим данным, не только апоптоз, но и некроз может регулироваться различными сигнальными белками, причем по-разному в нейронах и глии. В опытах на клетках глиобластомы с помощью протеомных микрочипов охарактеризована динамика изменений экспрессии 224 белков, участвующих в сигнальной трансдукции, клеточной адгезии, перестройках цитоскелета и регуляции клеточного цикла, после сублетального ФД воздействия и определены наиболее реактивные белки. В протеомном исследовании изменений экспрессии эпигенетических белков в коре мозга мышей, подвергавшейся ФД воздействию, выявлено повышение диметилирования гистона H3, сверхэкспрессия белков Kaiso и гистондеацетилаз HDAC-1 and HDAC-11, подавляющих транскрипцию. Повышение экспрессии фактора транскрипции E2F4 и аргининметилтрансферазы PRMT5 свидетельствовало о пролиферативных процессах. Фосфорилирование гистона H2AX свидетельствовало о появлении двойных разрывов ДНК, а снижение уровня белков MTA1/MTA1L1 и PML – о нарушении репарации ДНК.

Работа поддержана грантом Минобрнауки РФ «Организация научных исследований» № 790.

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КРИОКОНСЕРВАЦИИ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ**Biophysical approaches to cryopreservation of tissues and organs**

Фесенко Е.Е. (мл.), Шишова Н.В., Каурова С.А., Гахова Э.Н.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(496)773-92-12; факс: +7(496)733-05-09; e-mail: eugeny.ef@gmail.com

В настоящее время методы криоконсервации широко применяются в науке, медицине, сельском хозяйстве и биотехнологических производствах. Наряду с успехами в этой области, до сих пор остается нерешенным вопрос криоконсервации крупных массивов тканей и целых органов. Основным препятствием на пути к успешной криоконсервации любого биологического объекта является внутриклеточная кристаллизация воды. Образование кристаллов льда при охлаждении до температур ниже 0°C ведет к повреждению клеточных органелл, мембран и, как следствие, гибели клетки. Можно выделить два концептуальных пути решения данной проблемы.

Первый путь заключается в переводе внутриклеточной воды в стекловидное состояние (витрификация), когда не образуются отдельных кристаллов. Криоконсервация с использованием витрификации интенсивно развивается за рубежом последние 30 лет, импульсом к чему послужили работы 1980-х годов (Rall, Fahy, 1985). На практике витрификация требует достаточно высоких концентраций криопротекторов (до 70%) для того, чтобы быстро достичь критической температуры стеклования. Стеклование позволяет избежать повреждающего действия льда на клеточные структуры, обеспечивая тем самым высокую сохранность биологического объекта. Данный подход позволил добиться значительных успехов в криоконсервации яйцеклеток, ранних стадий эмбрионов млекопитающих и человека, фрагментов ряда тканей. Нами проведена работа по оценке наиболее перспективных направлений исследования в области витрификации.

Второй путь состоит в контролируемом образовании множества малых кристаллов (по оценкам не более 300-400 нм в диаметре), которые в силу размера не будут повреждать клеточных структур. Контроль процесса кристаллообразования, стохастического по своей природе, представляется крайне сложной задачей. Теоретически данная задача упрощается в том случае, если наличествует достаточное количество физических параметров, изменение которых, так или иначе, воздействует на процесс. Под этим углом зрения, перспективным направлением является использование для целей криоконсервации газовых гидратов. Основная идея заключается в том, чтобы вместо кристаллов льда контролируемо образовать в клетке кристаллы гидратов инертных газов. Инертные газы не токсичны, в отличие от классических криопротекторов, и свободно проходят через клеточные мембраны. Теоретически при образовании газовых гидратов появляется больше возможностей воздействовать на процесс кристаллообразования, нежели при образовании кристаллов льда (давление, соотношение количеств воды и газа, использование смесей газов и др.).

Однако подход к криоконсервации на основе гидратообразования до сих пор практически не исследован. Нами предпринята попытка оценить известные свойства газогидратов и образующих их газов с точки зрения механизмов криоповреждений и криозащиты, рассмотреть работы по замораживанию биологического материала в присутствии инертных газов и проанализировать перспективы развития этого направления.

РЕШЕНИЕ ПАРАДОКСА ЛЕВИНТАЛЯ ВОЗМОЖНО НА УРОВНЕ ФОРМИРОВАНИЯ И УПАКОВКИ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР БЕЛКОВ

А. В. Финкельштейн, С. А. Гарбузинский

Институт белка РАН, Пушкино, Московская область
afinkel@vega.protres.ru

Показано, что полный объём конформационного пространства белковой молекулы, в котором она ищет свою стабильную структуру, на много порядков меньше на уровне формирования и упаковки элементов вторичной структуры, чем на уровне аминокислотных остатков. На уровне аминокислотных остатков этот объём составляет $\sim 10^{21}$ состояний (оценка Левинтала, исходящая из наличия ~ 10 микросостояний по каждой из двух степеней свободы, имеющихся у каждого из L аминокислотных остатков цепи), а на уровне формирования и упаковки элементов вторичной структуры составляя – только $\sim L^{L/15}$, где $L/15$ – среднее, согласно статистике, число участков вторичной структуры в цепи из L аминокислотных остатков. Столь значительное уменьшение числа подлежащих перебору состояний цепи (для белка из 80 аминокислотных остатков – $\sim 10^{10}$ вместо $\sim 10^{160}$ состояний) приводит к тому, что даже полный перебор всех возможных – на уровне элементов вторичной структуры – состояний не требует астрономически большого времени и не делает невозможным нахождение белковой молекулой её наиболее стабильной укладки.

Работа была поддержана грантом № 14-24-00157 Российского Научного Фонда.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОКРАЩЕНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ И ЕГО РЕГУЛЯЦИИ**Molecular mechanisms of contraction and regulation of striated muscle**

Бершицкий С.Ю.1, Копылова Г.В.1, Кубасова Н.А.2, Левицкий Д.И.3, Матюшенко А.М.3, Набиев С.Р.1, Narayanan T.4, Ferenczi M.A.5, Щепкин Д.В.1, Цатурян А.К.2

1 – Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, 620049, ул. Первомайская, д. 106

2 – НИИ механики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Мичуринский пр. д. 1

3 – Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071, Ленинский пр. д. 33

4 – ESRF, 71 Avenue des Martyrs, 38000 Grenoble, Франция

5 – Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore

Тел.: +7(495)939-12-52; e-mail: tsat@imec.msu.ru

Сокращение поперечно-полосатых, т.е. скелетных и сердечной мышц происходит в результате взаимодействия моторного белка миозина, составляющего основу толстых нитей, с актином, входящим в состав тонких нитей [1]. Поперечная исчерченность этих мышц обусловлена высокоупорядоченной структурой саркомеров, образованных тонкими и толстыми нитями. Благодаря такой упорядоченности, молекулярные движения, лежащие в основе сокращения, можно изучать с помощью рентгеновской дифракции высокого временного разрешения с использованием синхротронных источников излучения [1]. В лекции представлены результаты многолетних исследований движений миозиновых молекул в сокращающихся волокнах скелетных мышц кролика в ответ на различные динамические воздействия: скачок температуры, импульсный фотолиз АТФ, ступенчатые изменения длины мышцы или скорости ее укорочения или удлинения на Европейском источнике синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция).

Регуляция сокращения поперечно-полосатых мышц осуществляется путем изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} при участии регуляторных белков – тропомиозина и тропонина, входящих в структуру тонких нитей. Тропомиозин образует непрерывный тяж, которые тянется вдоль всей актиновой нити. Состоящий из трех субъединиц тропониновый комплекс связан с тропомиозином и регулирует его взаимодействие с актином под действием Ca^{2+} . Без Ca^{2+} тропонин связывается с актиновой нитью так, что тропомиозин блокирует участки связывания миозина на актине, поддерживая расслабленное состояние мышцы. Связывание Ca^{2+} с тропонином освобождает тропонин-тропомиозиновый комплекс и смещает его, предоставляя миозину возможность присоединиться к актину. Как только это происходит, тропомиозиновый тяж смещается еще дальше и открывает участки связывания миозина на соседних мономерах актина. В лекции представлена механическая модель регуляции сокращения поперечно-полосатых мышц, учитывающая упругие свойства и спиральную структуру тропомиозина [2], а также результаты прямых измерений изгибной жесткости актин-тропомиозин-тропомиозиновых нитей с помощью оптической ловушки. С помощью этого метода нам впервые удалось зарегистрировать влияние точечных стабилизирующих мутаций в центральной части молекулы тропомиозина на её механические свойства[3].

Работа поддержана грантами РФФИ 13-04-40099, 13-04-40100, 13-04-40101 и 15-04-02174.

1. Кубасова, Н.А. и Цатурян, А.К., Успехи биол. химии, 2011, т. 51, сс. 233-282.
2. Metalnikova, N.A. and Tsaturyan, A.K., Biophys. J., 2013, vol. 105, no. 4, pp. 941-950.
3. Nabiev, S.R., Ovsyannikov, D.A., Kopylova, G.V., et al., Biophys. J., vol. 109, no. 2, pp. 373-379.

СОПОСТАВЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К МОДЕЛИРОВАНИЮ МЫШЛЕНИЯ

Comparison of certain theoretical approaches to the modeling cognitive process

Чернавский Д.С., Чернавская О.Д.

Физический институт им П.Н.Лебедева 119991, Москва, Ленинский проспект, 53
Тел. +7(499)1326296; e-mail: olgadmitcher@gmail.com

Сравниваются подходы: (1) Естественно-конструктивный (далее ЕКП); (2) Основанный на теории графов; (3) Концепция «Когнитом».

Первый (ЕКП) развит в работах [1,2] и основан на динамической теории информации [3] и континуальных математических моделях нейропроцессоров. Основные положения: конструкция аппарата мышления построена иерархически. Она состоит из пластин разного уровня, на которых расположены формальные динамические нейроны. Между ними имеются связи как внутри пластин, так и между ними. На нижнем уровне воспринимаются образы, на следующем уровне формируются символы образов и на последующих – символы более высокого уровня.

В теории графов принимается, что формальный нейрон есть узел графа, связи – ребра [3]. Формулируются топологические свойства графа и его частей. Связь с ЕКП в следующем: ЕКП- детализированный и более подробный вариант графа, в котором выделены автономные области (блоки), внутри которых узлы и ребра образуют сеть. Совокупность блоков образует граф, в котором узлы – блоки и ребра – связи. Такой граф имеет топологию типа «дерева», что необходимо в иерархической системе.

Третий подход – концепция «Когнитом» [4]. Вводятся понятия: «ког» - блок, состоящий из двух «гиперплоскостей». На одной имеется образ (набор нейронов), на другой – соответствующий ему «особый элемент». «Когнитом» есть иерархически организованный набор «когов», способный решать задачи мышления. Подходы согласуются, если отождествить понятия: «ког» = «блок формирования символа из образа», «гиперплоскость» = нейропроцессор (пластина), «особый элемент» = «символ», «когнитом» = вся конструкция аппарата мышления. Таким образом, все три подхода не противоречат, а дополняют друг друга.

1. Чернавская, О.Д., Чернавский, Д.С., Карп, В.П., и Никитин, А.П., О подходе к моделированию мышления с позиций динамической теории информации, Сб. под ред. Редько, М.: УРСС, 2014, сс. 29-88
2. Chernavskaya, O.D., Chernavskii, D.S., Karp, V.P., Nikitin, A.P., and Shchepetov, D.S., An architecture of thinking system within the dynamical theory of information, BICA Journal, 2013, vol. 6, pp. 147-158.
Кузнецов, О.П., Псевдооптические нейронные сети – голографический подход к информатике мозга, Сб. под ред. Редько, М.: УРСС, 2014, сс. 305-347.
3. Анохин, К.В., Когнитом: гиперсетевая модель мозга, Труды 5-й межд. конф. по когнитивной науке, Калининград, 2012.

ВАРИАЦИОННЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕХАНИКИ И НЕРАВНОВЕСНОЙ ТЕРМОДИНАМИКИ В ПРОБЛЕМЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ДВИЖЕНИЙ И ФОЛДИНГА БИОПОЛИМЕРНЫХ СТРУКТУР**Шайтан К.В.**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва 119991

Рассматривается конформационная динамика и формирование пространственной структуры биополимеров с точки зрения геометрии многомерного энергетического ландшафта. Показано, что принцип минимальной диссипации энергии для необратимых процессов в слабо неравновесных средах может быть применен к фолдингу макромолекулярных структур. Формулируется принцип максимально гладкого (осторожного) спуска репрезентативной точки по стенкам энергетической воронки при фолдинге биополимерной цепи в реальной (вязкой) среде и следствия из этого принципа для кинетики фолдинга. Обсуждается механическая корреляция конформационных степеней свободы макромолекулы, вызванная принципом минимальной скорости диссипации энергии. Предсказания модели согласуются с результатами молекулярного моделирования аналогичных систем. Обсуждается взаимосвязь между строением многомерной поверхности потенциальной энергии и кинетикой фолдинга. Уточняется концепция энергетической воронки. Развивается модель параболической энергетической воронки, формируемой не валентными взаимодействиями узлов полимерной цепи. Релаксационная кинетика фолдинга для параболической модели энергетической воронки является практически экспоненциальной. Параметры модели допускают независимую оценку и лежат в физически разумных пределах.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00029.

ПЕРВИЧНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЗАРЯДОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗА ТИПА 2

Шувалов В.А.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Московская обл., г. Пущино,
ул. Институтская, 2

Тел.: 8(4967)733601/ Факс: 8(4967)330532; e-mail: shuvalva@gmail.com

Исследования бактериальных реакционных центров и ядерного комплекса фотосистемы 2 растений с помощью лазерных импульсов длительностью $\sim 20-40$ фс с параллельной и перпендикулярной ориентацией электрических векторов зондирования и накачки показали, что при комнатной температуре в бактериальных РЦ происходит первичное разделение зарядов в первичном доноре электрона P870* с последующим переносом электрона на мономер В_А (3 пс) и на (бактерио)феофитин (1 пс). В ФС 2 при 278 К первичное разделение зарядов происходит в первичном доноре электронов (димере хлорофилла P680) с последующим переносом электрона на мономер Хл_{D1} (с временной константой $\sim 0,9$ пс) и далее - на молекулу феофитина за время ~ 14 пс. Показано, что при низкой температуре в комплексах ядра фотосистемы 2 (ФС2) растений могут альтернативно функционировать два различных донора электрона: димер молекул хлорофилла P₆₈₀ и мономерный хлорофилл Хл_{D1}.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-40297 Н.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РАСПОЗНАВАНИЯ И ВОСПРИЯТИЯ СИГНАЛОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Modeling of recognition processes and perception of signals in living systems

Яхно В.Г.

Институт прикладной физики РАН, Россия, Н.Новгород, ул. Ульянова, 46,
yakhno@appl.sci-nnov.ru

На сегодняшнем уровне физических исследований потребность осмысленного и компактного представления уже полученного объемного набора экспериментальных данных о поведении живых систем весьма актуальна. Для формализованных описаний поведения "интеллектуальных систем" и возможностей сравнения их с экспериментальными данными необходимы адекватные модельные представления об их архитектуре и динамических режимах реагирования.

В докладе обсуждается вариант набора моделей, "эффективных базисных компонент – элементов инструментария для конструктора", с помощью которых можно осуществлять компоновку регистрируемых экспериментальных данных (сжимая их объем), а также проводить разработку "технических аналогов" живых систем.

Показано, что с их помощью могут описываться:

1) быстрые автоматические процессы выделения или подавления тех сигналов, на которые система была обучена ранее;

2) различные режимы как бессознательного восприятия, пропуска сигнала (когнитивные фильтры), так и осознанной обработки, оптимизирующей настройки системы; возможно осуществление процедур планирования будущих состояний системы, собственное целеполагание; возможно выделение таких архитектурных связей в системе, которые аналогичны процессам интуитивного восприятия информации;

3) многоуровневые режимы обработки входных сигналов с целью "профессионально-адекватных" реакций на внешнее воздействие; управления со стороны высших уровней, так называемых модулей "Я", "ЭГО", или "Самость"; режимы, специализированные по типу обрабатываемой информации, например, а) – "одномоментное" принятие решений по ассоциациям, обычно проводят аналогию с работой правого мозга; и б) – поэтапно логическое принятие решений с множественными промежуточными результатами, обычно проводят аналогию с работой левого мозга;

4) процедуры преодоления противоречий в "данных", "знаниях", "принятых решений" и т.п., которые запускаются условиями разного вида «диссонансов», ошибками между реальными и ожидаемыми сигналами; описание процедур трансформации, развития иерархии "Самостей" с различными уровнями отражения и понимания процессов в природе.

Обсуждается постулируемое утверждение, что **определяющий признак живой системы связан с возможностью создания внутренней интерпретации распознающей системой входного сигнала и использовании этой интерпретации для оптимизации её текущего состояния на основе прошлого опыта.** Фактически, субъективная реальность системы представлена умением формировать интерпретации о внешних сигналах и на их основе генерировать предсказания, внутренние прогнозы.

Показано, что модели процессов активного распознавания с элементами "мышления" позволяют рассмотреть множество процессов, которые без их использования представлялись бы загадочными.

Структура и динамика белков и их комплексов

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КАРДИОАКТИВНЫХ ТЕТРАПЕПТИДОВ

Spatial structure of the cardioactive tetrapeptides

Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И., Гаджиева Л.С.

Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем, AZ-1148, Баку, ул. Ак. З.Халилова, 23, Азербайджан;
e-mail: Abbasli_Rena@mail.ru

В настоящее время при создании новых лекарственных препаратов исследователи часто обращаются к использованию собственных регуляторов человеческого организма – пептидным молекулам. Выяснение структурно-функциональных свойств этих пептидов имеет большое прикладное значение в медицине и фармакологии. Чтобы определить природу регуляторных пептидов и выполняемые ими функции, необходимо определить пространственное строение и их структурно-функциональную организацию.

Целью данной работы является изучение пространственной структуры и конформационных свойств кардиоактивных тетрапептидных молекул Gly-Phe-Gly-Asp, Gly-DPhe-Gly-Asp, Gly-Ser-Trp-Asp и Gly-DSer-Trp-Asp. Сами тетрапептиды были выделены из мозга японского осьминога *Octopus minor*. Эти тетрапептиды вовлечены в возбуждающий контроль сердечно-сосудистой системы осьминога как нейропептиды и нейрогормоны. Стереоизомеры в положении второго аминокислотного остатка также были изолированы, однако их сократительная деятельность оказалась в десять раз меньше соответствующего пептида.

Расчет проводился в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Кардиопептиды Gly-Phe-Gly-Asp и Gly-DPhe-Gly-Asp включали в себя 49 атомов и 15 переменных двугранных углов. Молекулы Gly-Ser-Trp-Asp и Gly-DSer-Trp-Asp содержали 57 атомов и 17 двугранных углов. Расчет проводился на основе низкоэнергетических конформационных состояний монопептидов. Для каждого из тетрапептидов были найдены все возможные низкоэнергетические пространственные структуры. Данные тетрапептиды имеют структурную и конформационную изомерию. Структурные изомеры характеризуются разными структурными формулами, а конформационные изомеры различаются пространственными формами одной и той же молекулы.

Замена второго остатка на D-изомер приводит к смещению конформационного равновесия природной пептидной молекулы, так как D-изомеризация отражается на конформационной свободе самого аминокислотного остатка. Если для L-аминокислоты низкоэнергетическими являются B, R, L области, то для D-изомера разрешенными становятся P, L и R области на конформационной карте ф-ψ углов основной цепи.

Для каждой структуры были определены значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулу, оценены величины энергии внутри- и межостаточных взаимодействий. Низкоэнергетическими конформациями тетрапептидов оказались свернутые формы основной цепи RRRR, PRRR, RRBR, RBPR для природных молекул и BPRR, LPRR, RPRR для молекул с D – изомерами. Такая свернутая форма основной цепи приводит к сближенности боковые цепи аминокислот и к возникновению сильных взаимодействий между ними. В низкоэнергетических конформациях молекул так же была определена конформационная подвижность боковых цепей аминокислот путем построения конформационных карт. Исследование конформационной динамики пептидов позволило определить наиболее подвижные боковые цепи кардиоактивных тетрапептидов, способные принимать участие во взаимодействиях с рецепторами.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ СТРОЕНИЕ ТАХИКИНИНОВОГО НЕЙРОПЕПТИДА УПЕРОЛЕИНА**Spatial structure of tachykinin neuropeptide uperolein****Агаева Г.А.**

Институт физических проблем, Бакинский государственный университет,
AZ-1148, Баку, ул. 3.Халилова, 23
e-mail: gulshen@mail.ru

Уперолеин – тахикининовый пептид впервые был выделен из кожи австралийских лягушек *Uperoleia rugosa* и *Uperoleia marmorata*. Этот ундекапептид с аминокислотной последовательностью: $\text{pyroGlu1-Pro2-Asp3-Pro4-Asn5-Ala6-Phe7-Tyr8-Gly9-Leu10-Met11-NH}_2$ обладает сильной гипотензивной активностью [1]. Молекула уперолеина по своей химической структуре и спектру биологических свойств похожа на другого тахикининового нейрпептида – фисаламина, обладающего гомологичной аминокислотной последовательностью: $\text{pGlu1-Ala2-Asp3-Pro4-Asn5-Lys6-Phe7-Tyr8-Gly9-Leu10-Met11NH}_2$. Уперолеин также как и фисаламин обладает вазодилаторными свойствами, способствует снижению артериального давления, стимулирует выделение слюны, сокращение гладких мышц и др.. Помимо прочего, уперолеин проявляет также спазмогенную активность в клетках гладкой мускулатуры желудка. Уперолеин предпочтительно взаимодействует с тахикининовым рецептором NK1 [1]. Для детального исследования механизма воздействия олигопептида уперолеина необходимо знание его пространственного строения и конформационных особенностей, требуемых для комплементарного взаимодействия этого лиганда с рецепторами реагирующей клетки. Методом полуэмпирического конформационного анализа исследовано пространственное строение молекулы уперолеина. Конформационное исследование уперолеина проводилось на основе последовательно решаемых структурных задач. Определены стабильные конформации биологически активных С-концевых пентапептида и гептапептидов молекулы уперолеина. Конформационный анализ молекулы уперолеина показал, что этот пептид может быть описан набором низкоэнергетических конформаций, которые предпочтительно формируют α -спираль на С-конце молекулы. Показано, что молекула уперолеина обладает ограниченным числом низкоэнергетических структур, характеризующихся относительно конформационно жёстким С-концевым гептапептидом и лабильным N-концевым трипептидом. Сопоставление результатов выявило существенную преобладание конформационных свойств фрагментов уперолеина по мере увеличения длины рассматриваемой цепи. Получены энергетические параметры всех сил, стабилизирующих пространственные структуры уперолеина, выявлена система регулярных водородных связей, характерных для правой α -спирали. Показана важность отдельных межостаточных взаимодействий в образовании конформационно жестких участков уперолеина. Данное исследование выявило степень конформационной подвижности молекулы уперолеина. Полученные результаты сопоставлены с имеющимися данными биологического тестирования. Выяснена существенная структурообразующая роль некоторых аминокислотных остатков в стабилизации оптимальных структур уперолеина.

1. Anastasi, A., Erspamer, V., and Endean, R., *Experientia*, 1975, vol. 31, no. 4, pp. 394-395.

КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА МОЛЕКУЛ ГЕМОКИНИНА1 ЧЕЛОВЕКА И ГЕМОКИНИНА1 МЫШИ/КРЫСЫ

Conformational dynamics of human hemokinin1 and mouse/rat hemokinin1 molecules

Агаева У.Т.1, Агаева Г.А.1, Годжаев Н.М.2

1 – Институт физических проблем, Бакинский государственный университет, AZ-1148, Баку, ул. З.Халилова, 23;

2 – Университет Кавказ, AZ-0101, Баку, пос.Хырдалан,16 км Сумгаитского шоссе
e-mail: gulshen@mail.ru, nqocayev@qu.edu.az

Гемокинины-1 выделены сравнительно недавно с помощью клонированного препрота-хикининового гена (ТАС-4) у млекопитающих и у человека. К гемокининам относятся молекулы гемокинина-1 человека hHK-1 и гемокинина-1 мыши/крысы m/rHK-1. Обе молекулы состоят из 11 аминокислотных остатков каждая. Гемокинины-1 относятся к семейству тахикининов млекопитающих [1]. Тахикинины играют важную роль в патогенезе бронхиальных, воспалительных и желудочно-кишечных болезней, а также приступов мигрени, депрессии, эпилепсии и переносе болевых ощущений. Установлено, что гемокинины могут взаимодействовать с тремя различными типами тахикининовых рецепторов NK1, NK2 и NK3, но предпочтительно взаимодействуют с NK1 рецептором [1]. Кроме свойств, присущих всем тахикининам, гемокинины-1 стимулируют продукцию антител, усиливают генерацию клеток памяти человека, участвуют в бронхоспазме, проявляют также антимикробную активность против микроорганизмов кожи. Эти родственные пептиды одинаково проявляют ингибиторный эффект на пролиферацию и дифференциацию раковых клеток линии HL-60 при лейкемии человека, т.е. подавляют размножение и видоизменения таких клеток, аккумулируя их развитие на ранней стадии. Было показано также, что молекулы гемокинина-1 человека, его усеченного фрагмента hHK-1(4-11) и гемокинина-1 мыши/крысы оказывают влияние на сердечную деятельность и на коронарные сосуды изолированной сердечной мышцы. Поиск высокоактивных агонистов или антагонистов тахикининовых рецепторов на основе исследования особенностей пространственной организации гемокининов, позволит создать препараты способные или стимулировать или блокировать конкретное физиологическое воздействие в лечении ряда заболеваний. Исследование конформационных свойств молекул гемокининов проводилось сначала методом молекулярной механики с использованием стандартной геометрии, а затем методом молекулярной динамики. При конформационном расчете пептидов учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионные потенциалы. Настоящее исследование показало, что конформационной особенностью обеих молекул гемокининов является наличие лабильности на N-концевом участке молекул при относительно консервативном C-концевом октапептидном фрагменте. В результате расчетов были определены энергетически предпочтительные области двугранных углов, взаимное расположение остатков и выявлена тенденция к образованию сегмента с регулярной α -спиральной структурой в стабильных конформациях молекул. Полученные данные позволяют заключить, что молекулы гемокининов содержат устойчивые элементы пространственной структуры, которые могут быть ответственны за формирование конформаций, необходимых для связывания с тахикининовыми рецепторами.

1. Kurtz, M.M., Wang, R., Clements, M.K., Cascieri, M.A., Austin, C.P., Cunningham, B.R., Chicchi, G.G., and Liu, Q., Gene, 2002, vol. 296, pp. 205-212.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННЫХ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ИНСУЛИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМФИФИЛЬНОГО ДИПЕПТИДА ARG-PHE**Formation of heterogenous supramolecular structures of insulin induced by the amphiphilic Arg-Phe dipeptide****Агутина Е. Ю., Гурвиц Б. Я.**ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2
Тел.: +7-962-954-98-25; факс: +7(495) 954-27-32; e-mail: smeu1989@mail.ru

Исследование молекулярных механизмов регуляции стресс-индуцируемой агрегации белков под действием природных шапероноподобных агентов представляется весьма актуальным при решении биотехнологических и медицинских задач. Целью настоящей работы явилось изучение возможности направленного структурирования белковых агрегатов с помощью биогенных низкомолекулярных эффекторов, в числе которых свободная аминокислота аргинина (Arg) и низкомолекулярные Arg-содержащие амфифильные пептиды. Исследовали кинетику агрегации рекомбинантного инсулина человека (pI 5.4), выбранного в качестве модельного белкового субстрата, и морфологические свойства агрегатов при различных экспериментальных условиях с использованием динамического лазерного светорассеяния, спектроскопии кругового дихроизма, флуоресцентной спектроскопии, трансмиссионной электронной (ТЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Показано, что при изменении значений pH инкубационной среды от 7.0 до 8.0 наблюдаются противоположно направленные эффекты Arg при концентрациях в диапазоне 10-100 мМ: торможение агрегации частично развернутого в состоянии стресса инсулина (0,2 мг/мл) при pH 7.0 и значительное ускорение процесса при pH 8.0. Оказалось, что подобным свойством обладает и амфифильный дипептид Arg-Phe при значительно меньших концентрациях (1-2 мМ). Выявленные эффекты, в основе которых лежат электростатические взаимодействия, противоречат общепринятому мнению о том, что Arg является универсальным шапероноподобным агентом, тормозящим агрегацию белков.

С использованием ТЕМ и АСМ показано, что инсулин в присутствии Arg образует гетерогенные надмолекулярные структуры – гранулярные частицы с кажущимся диаметром 3-5 нм, которые выстраивались в цепи длиной до 200 нм. Агрегаты инсулина, образуемые в присутствии Arg, значительно отличались по форме и размерам от частиц, сформированных в его отсутствие. В присутствии пептида Arg-Phe наряду с малыми гранулярными частицами диаметром 3-8 нм обнаружены агрегаты размером до 15-20 нм и длинные волокна до 300 нм. Предположено, что данные эффекторы могут индуцировать изменения физико-химических характеристик противоположно заряженного белка, что приводит к агрегации и накоплению надмолекулярных ассоциатов. Это предположение подтверждается также тем, что противоположно направленные эффекты Arg и Arg-Phe наблюдали и на агрегации другого кислого белка, альфалактальбумина коровьего молока (pI 4.8), в концентрациях 0,5-1 мг/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности тонкой регуляции процесса агрегатообразования под действием природных низкомолекулярных агентов с помощью изменения pH среды в узком диапазоне физиологических значений, что расширяет современные представления о функционировании инсулина в живой системе и его использовании в медицине.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ 14-04-01530-а.

НЕВАЛЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПАПАИНА

Nonvalent enzyme-substrate complexes of papain

Алиев Р.Э.

Бакинский Государственный Университет, AZ1148, Баку, улица академика З. Халилова, 23
Тел.: (+994 12)539 05 35; факс: (+9942 12)598 33 76; e-mail: rashid_aliev@mail.ru

Протеолитический фермент папаин состоит из одной полипептидной цепи и содержит 212 аминокислотных остатков. Шесть из семи остатков Cys образуют три дисульфидных мостика. Сульфгидрильная группа седьмого CysH – 25 является частью активного центра папаина. Анализ кристаллографических структур нативных цистеиновых протеаз и их комплексов с субстратоподобными ингибиторами [1-2] выявил, что молекула папаина состоит из двух доменов, разделенных глубокой полостью, наподобие желоба, на поверхности которой находится каталитически активный центр, включающий триаду CysH25 – His159 – Asn175. Боковые цепи этих остатков непосредственно участвуют в каталитическом акте гидролиза пептидной связи. Важную роль при сорбции субстрата в активном центре папаина играет также боковая цепь Gln19.

Ферментативный катализ многостадийный процесс. Начальной стадией ферментативной реакции является образование невалентного фермент-субстратного комплекса. Для понимания стереохимических причин эффективности и специфичности ферментативной реакции, наряду с информацией о нативной структуре фермента и субстрата необходимы данные о взаимоотношении пространственных структур субстрата и активного центра фермента в ходе каталитического акта. Решение этой задачи не может быть получено без привлечения теоретических, расчетных методов.

В настоящем сообщении, используя трехмерные структуры нативного папаина и его ингибиторных комплексов, на классической основе при помощи полуэмпирического метода атом-атомных потенциалов изучены конформационные аспекты взаимодействия папаина с рядом модельных субстратов: Ac – L – Leu – NHMe; Ac – L – Tyr – NHMe; Ac – L – Cys – NHMe. Выбор этих молекул при исследовании невалентных комплексов папаина связан с тем, что предпочтительно расщепляются пептидные связи, в образовании которых эти аминокислоты участвуют в P1 положении. При проведении конформационных расчетов невалентных комплексов, мы исходили из того, что осуществляемый цистеиновыми протеазами гидролиз пептидной связи относится к ковалентному типу катализа [3] и не были связаны ни с какими априорными предположениями о конкретной схеме катализа. При расчете продуктивных конформаций невалентных комплексов папаина с субстратами мы использовали подход к изучению ферментативного катализа, допускающий разделение и независимое рассмотрение конформационных и электронных стадий каталитического акта [4]. Показано, что реакционные остатки CysH25, His159, Asn175 и Gln19 в активном центре нативного фермента и его невалентных комплексах находятся в низкоэнергетических состояниях. Конформационные перестройки этих остатков при образовании фермент-субстратных комплексов не требуют преодоления высоких потенциальных барьеров и совершаются исключительно за счет стабилизирующих взаимодействий между ферментом и субстратом. Расчет позволил получить количественные оценки энергетических и геометрических параметров всех возможных состояний субстрата в поле активного центра фермента.

1. Drenth, I., Kalk, K.H., and Swen, H.M., Biochem., 1976, vol.15, pp. 3731-3738.
2. Zhang, M., Wei, Z., et al., J. Mol. Biol., 2006, vol. 358, pp. 97-105.
3. Антонов, В.К., Химия протеолиза, М.: Наука, 1991, с. 504.
4. Попов, Е.М., Структурно-функциональная организация белков, М.:Наука, 1992, с. 358.

БАКТЕРИОФЕРРИТИН Dps, КАК БЕЛОК НУКЛЕОИДА СО СТРУКТУРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ**Bacterioferritin Dps, as nucleoid protein with structural specificity**

Антипов С.С.1,2,3, Мелехов В.В.4, Артюхов В.Г.1., Озолинь О.Н.2,3

1 – Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1;

2 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3;

3 – Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино, пр. Науки, 3;

4 – Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 7.

Тел.: +7(473) 220-8981; Факс: +7(4967)33-05-09; e-mail.: ss.antipov@gmail.com

Мультифункциональный белок *E.coli* Dps играет важную роль в усвоении железа и ключевую роль в упаковке бактериального генома. Его 12 мономеров формируют сферическую структуру, во внутренней полости которой может накапливаться до 400 ионов окисленного железа. Кроме того, каждый мономер имеет гибкий N-конец, который участвует во взаимодействии с ДНК и в формировании белок-белковых контактов [1]. Процессы окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} и сохранения ионов железа в доступной форме являются хорошо изученными. Но способ взаимодействия Dps с ДНК остаётся не до конца понятным. Принято считать, что он связывается с ДНК без специфичности к какой-либо последовательности оснований или структуре двойной спирали [2], но это противоречит данным о способности Dps избирательно влиять на экспрессию ряда генов.

Так, нами было обнаружено разное сродство Dps к двум фрагментам ДНК из регуляторной области гена *dps*. Методом атомно-силовой микроскопии было установлено, что в комплексах с линейными фрагментами ДНК Dps преимущественно связывается с их концами, что предполагало возможность его взаимодействия с разветвленными структурами. Для проверки этой гипотезы были спроектированы самособирающиеся Y-образные молекулы ДНК и установлено, что Dps имеет большое сродство к центру ветвления в этих молекулах [3]. Мы предполагаем, что ключевым фактором, определяющим такую селективность, является то, что 12 ДНК-связывающих модулей белка не равномерно распределены по поверхности белковой глобулы, а формируют триплеты на четырёх вершинах додекамера [3]. Наличие платформы для взаимодействия с тремя модулями на разветвлённых участках или локально денатурированных концах ДНК может быть основой наблюдаемой избирательности. Известно, что Y-образные структуры могут формироваться на любом сегменте ДНК содержащем прямые повторы [4], например, на сайтах связывания регуляторных белков в промоторах, REP-элементах или последовательностях CRISPR. В промоторной зоне *dps*, например, имеется 4 пары прямых повторов. Структурное состояние таких геномных областей должно быть под специальным контролем клеточных регуляторных систем, но информация о них пока отсутствует. Поэтому обнаруженное нами сродство Dps к Y-образным структурам имеет большое биологическое значение. Оно объясняет способность этого белка избирательно влиять на экспрессию отдельных генов при низкой концентрации в клетках (условия экспоненциального роста) и его же способность вызывать тотальную конденсацию генома во время стационарного роста, когда число молекул Dps увеличивается в десятки раз, что способствует формированию многочисленных белок-белковых и ДНК-белковых контактов.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России № 2014/281

1. Haikarainen, T. and Papageorgiou, A.C., Cell. Mol. Life Sci., 2010, vol. 67, pp. 341-351.
2. Ceci P., et al., Nucleic Acids Res., 2004, vol. 32, pp. 5935-5944.
3. Melekhov, V.V., et al., PloS One, 2015, vol. 10, no. 5, pp. e0126504.
4. Khomyakova E.B. et al., FEBS Letters, 1998, vol. 422, pp. 265-268.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЫ ОКТАРФИНА

Theoretical conformational analysis of the octarphin molecule

Ахмедов Н.А., Аббаслы Р.М., Исмаилова Л.И., 1 Ахмедова С.Р.2

1-Бакинский Государственный Университет. Баку, AZ-1148 ул.акад.З.Халилова,23 БГУ, Институт Физических проблем ; 2-Азербайджанский Технический Университет
e-mail: Namiq.49@bk.ru

Аминокислотная последовательность октарфина соответствует фрагменту 12-19 β -эндорфина. Установлено, что октарфин связывается с макрофагами с высокой аффинностью и специфичностью. Ингибирующая активность аналогов октарфина была в 100 и более раз ниже, чем у октарфина. Показано, что октарфин стимулирует активность иммунокомпетентных клеток мыши *in vitro* и *in vivo*: при концентрации 1-10 нМ он увеличивал адгезию и распластывание перитонеальных макрофагов, а также их способность переваривать бактерии вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*. Внутри-брюшинное введение пептида приводило к возрастанию активности перитонеальных макрофагов, а также Т- и В- лимфоцитов селезенки.

Пространственная структура молекулы октарфина Thr1-Pro2-Leu3-Val4-Thr5-Leu6-Phe7-Lys8-NH₂ исследована методом теоретического конформационного анализа. Расчет конформационных состояний молекулы октарфина выполнен с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий, а также водородных связей.

Пространственная структура молекулы октарфина изучена фрагментарно. Исходные для минимизации энергии структурные варианты октарфина формировались из восьми форм основной цепи N-концевого пентапептидного и C-концевого тетрапептидного фрагментов. Низкоэнергетические структуры октарфина имеют 15 различных форм основной цепи. В отношении геометрии N-концевого тетрапептидного фрагмента Thr1-Val4 низкоэнергетические конформации октарфина распадаются на четыре группы.

В оптимальных конформациях октарфина вклад невалентных взаимодействий изменяется в интервале энергии (-40.9)-(-33.9) ккал/моль, электростатических взаимодействий (7.4-11.0) ккал/моль, торсионных взаимодействий (4.3-8.1) ккал/моль. Самой стабильной конформацией молекулы октарфина является B₁₂RB₂₁R₁R₁₂B₃₁B₁B₃₂ шейпа efeffee. В этой конформации аминокислотные остатки так находятся в пространстве, что Val4, Thr5, Leu6 эффективно взаимодействуют с N-концом молекулы, Leu3, Val4, Leu6 с C-концевым остатком Lys8. Конформация B₁₂BR₂₂R₁R₁₂R₂₁R₂R₂₁₂₂ шейпа eeffff имеет относительную энергию 1.1 ккал/моль. Как видно, N-концевой дипептид находится в развернутой форме основной цепи, остальные аминокислотные остатки свернуты в спиралеподобные и образуют компактную структуру молекулы октарфина. В этой конформации Thr1 (суммарный вклад с остальными аминокислотными остатками составляет (-9.4) ккал/моль), Pro2 (суммарный вклад с остальными аминокислотными остатками составляет (-4.7) ккал/моль), Leu3 (суммарный вклад - (-9.1) ккал/моль) и Leu6 (суммарный вклад - (-6.0) ккал/моль) эффективно взаимодействуют с остальными аминокислотными остатками и стабилизируют эту структуру. Группа C представлена пятью конформациями, низкоэнергетической конформацией группы является B₁₂RR₂₁B₁R₁₂B₃₁B₁B₃₁₂₂ шейпа effefee. Эта конформация от глобальной конформации отличается формой основной цепи Trp3-Phe4.

Расчет показал, что боковые цепи Thr1, Pro2, Leu3, Val4 и Leu6 ориентированы внутри молекулы, а боковые цепи Phe7 и Lys8 - в среду самых низкоэнергетических пространственных структур молекулы октарфина. Иными словами, они принимают положения, наиболее выгодные с точки зрения межмолекулярных взаимодействий. Теоретический конформационный анализ октарфина привел к таким структурным организациям молекулы, которые не исключают реализацию гормонами целого ряда самых разнообразных функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ ЭНДОМОРФИНА**Structural organization of the endomorphine molecule****Ахмедова С.Р.1, Шюкюров Н.М.1, Ахмедов Н.Ф.2, Ахмедов Н.А.2**

1 – Азербайджанский Технический Университет,

2 – Бакинский Государственный Университет. Баку, AZ-1148 ул.акад.З. Халилова, 23,

БГУ, Институт Физических проблем

e-mail; Namiq.49@bk.ru

Эндоморфин был выделен из головного мозга млекопитающих. Его принято считать эндогенным агонистом для энкефалинов и опиатных рецепторов динорфинов. Опиоидные рецепторы обладают эффектом морфина, действуя с помощью эндогенных лигандов, при выполнении различных функций центральной и периферической нервных систем. Эта молекула отличается сильным и селективным сродством для μ -опиоидного рецептора.

Эндоморфин, как и морфин, является мощным обезболивающим средством. Кроме того, μ -опиоидные рецепторы экспрессируются в макрофагах и моноцитах, указывая тем самым, что опиоидные пептиды, полученные во время воспаления, могут стимулировать опиоидные рецепторы.

Структурная организация молекулы эндоморфина исследована методом теоретического конформационного анализа. Расчет конформационных состояний этой молекулы выполнен с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий, а также водородных связей. Невалентные взаимодействия оценивали по потенциалу Леннарда-Джонса с параметрами Момани и Шераги. Электростатические взаимодействия рассчитывались в монополярном приближении по закону Кулона, с использованием парциальных зарядов на атомах. Водородные связи оценивались по потенциалу Морзе. Конформационный анализ тетрапептидной молекулы Tyr1-Pro2-Trp3-Phe4-NH₂ выполнен на основе предпочтительных состояний соответствующих аминокислотных остатков. Известно, что у любого аминокислотного остатка, за исключением глицина, находящегося перед пролином, все конформации с R-формой высокоэнергетичны. Поэтому, такое состояние у Tyr1 из расчета исключалось. Следовательно, исходные структурные варианты могли обладать только следующими четырьмя шейпами пептидного скелета: eee, eef, efe и eff. Результаты расчета молекулы эндоморфина обнаружили наличие сильной энергетической дифференциации как по конформациям, так и по формам основной цепи и шейпам. В энергетический интервал 0-5 ккал/моль попадают конформации трех шейпов пептидного скелета eee, eef, и eff. Шейпы eee, eef представлены, соответственно 18 и 10 конформациями, а шейп eff всего тремя конформациями. В низкоэнергетических структурах возникают эффективные взаимодействия между Tyr1 и Pro2, Trp3, Phe4, а также между Trp3 и Phe4. Теоретический конформационный анализ эндоморфина привел к таким структурным организациям молекулы, которые не исключают реализацию гормоном целого ряда самых разнообразных функций, требующих строго специфических взаимодействий с различными рецепторами.

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИПЕПТИДНЫМИ ЦЕПЯМИ

Features of amyloid formation of different polypeptide chains

Балобанов В.А.1, Турчина А.И.1, Катина Н.С.1, Черткова Р.В.2, Бычкова В.Е.1

1 – ИБ РАН, 142290, г.Пущино, ул. Институтская,4

2 – ИБХ РАН, 117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, 16, стр. 10

Тел./факс+7 (495) 514-02-18; e-mail: uralm62@rambler.ru

Образование амилоидных структур является одним из возможных способов самоорганизации полипептидной цепи. Многие аминокислотные последовательности имеют возможность образовать межмолекулярную амилоидную кросс-бета структуру. В реальности образование или необразование таких структур в значительной мере зависит от контекста аминокислотной последовательности окружающей амилоидогенный участок. Также важную роль играют такие условия как pH, ионная сила, температура. Внешние условия влияют в первую очередь на взаимное расположение различных конформационных состояний на энергетическом ландшафте полипептидной цепи. В данном сообщении рассматривается и сравнивается образование амилоидных структур тремя вариантами полипептидных цепей. Первый – K3 пептид бета2микроглобулина. Этот пептид целиком входит в кросс бета структуру и не имеет стабильной упорядоченной структуры в мономерной форме. Второй – альбелбетин. Этот искусственный белок состоит из двух идентичных повторов и в мономерной форме имеет стабильную вторичную структуру и находится в состоянии расплавленной глобулы. Третий – апомиоглобин. Это полноценный белок, имеющий плотную упаковку боковых групп в нативном состоянии и способный частично или полностью переходить в состояние расплавленной глобулы при изменении условий. В ходе исследований выявлены ключевые факторы, влияющие на амилоидообразование данными объектами. Проведён сравнительный анализ и определены особенности амилоидообразования, присущие каждому объекту. Полученные результаты позволяют лучше понять положение амилоидной структуры на сети конформационных состояний полипептидных цепей.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-24-00157

ВЛИЯНИЕ ЕДИНИЧНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИТОХРОМОВ P450 СЕМЕЙСТВА CYP74**Effect of single amino acid on the catalytic properties of cytochromes P450 of the CYP74 family**

Бессолицына Е.К., Смирнова Е.О., Горина С.С., Ермилова В.С., Топоркова Я.Ю., Мухтарова Л.Ш., Гоголев Ю.В., Гречкин А.Н.

ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, 420111, Казань ул. Лобачевского, 2, стр. 31, а/я 30

Тел.: +7(843)2927347, +7(843)2927535; факс: +7(843)2927347; e-mail: bessolicina_elena@mail.ru

В отличие от большинства цитохромов P450, являющихся монооксигеназами, ферментам CYP74 не требуется в качестве субстрата ни молекулярный кислород, ни окислительно-восстановительный партнер. В качестве субстрата и донора кислорода ферменты этого семейства используют гидроперекиси жирных кислот. В связи с этим, их кислород-связывающий домен является вырожденным; у ферментов CYP74 он заменен доменом IHCD, который участвует в каталитическом действии. Ферменты CYP74, включающие в себя алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС), превращают гидроперекиси жирных кислот в разнообразные по своей структуре продукты: окиси аллена, дивиниловые эфиры, полуацетали и эпокси спирты. АОС и ДЭС функционируют как дегидразы; ГПЛ и ЭАС являются изомеразы.

Анализ первичных структур ферментов CYP74 выявил несколько консервативных доменов, некоторые из которых находятся внутри субстрат-распознающих сайтов, типичных для всех цитохромов P450. Был выбран ряд сайтов внутри этих доменов, где были проведены замены аминокислотных остатков. Полученные данные демонстрируют взаимопревращения ферментов CYP74 в результате сайт-направленного мутагенеза. Три мутации привели к полному превращению: АОС в ГПЛ, ДЭС в АОС, ГПЛ в ЭАС. Несколько мутаций привели к изменениям в различной степени в каталитической активности. Кроме того, были получены мутанты с двойной и тройной активностями. В результате сайт-направленного мутагенеза были выявлены первичные детерминанты катализа CYP74.

Полученные данные подтверждают предположение о сходстве механизмов катализа у разных ферментов CYP74 и свидетельствуют о том, что эпоксиаллильный радикал представляет собой не только промежуточный продукт катализа CYP74, но и своеобразную точку переключения в механизме катализа CYP74. Первой стадией катализа у всех ферментов CYP74 является гомолиз гидроперокси-группы с образованием эпоксиаллильного радикала и соединения II (FeIV–OH комплекс). В зависимости от первичной структуры фермента эпоксиаллильный радикал претерпевает различные превращения. Второй стадией у ЭАС является присоединение гидроксильного радикала с образованием эпоксигидрокси-октадеценовой кислоты, которая в результате гидролиза превращается в ряд тригидрокси-октадеценовых кислот. Второй стадией у АОС является отщепление атома водорода с образованием экзо-двойной связи при оксиранировании, что приводит к образованию окиси аллена. У ГПЛ и ДЭС вторая стадия иная – гомолиз углерод-углеродной связи в оксиранировании с образованием винилоксикарбинильного радикала. Заключительным этапом катализа ДЭС является отщепление атома водорода от радикала с образованием второй двойной связи дивинилового эфира. Заключительным этапом катализа ГПЛ является рекомбинация винилоксикарбинильного радикала с гидроксильным радикалом с образованием полуацетала, который распадается на альдегид и оксокислоту.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (15-04-04108-а, 15-04-08310-а, 14-04-01532-а) и МК-6529.2015.4.

ОБРАЗОВАНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ДОЛГОЖИВУЩИХ РЕАКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ

Formation of oxidized long-lived reactive species of proteins by the action of physical environmental

Брусков В.И., Гудков С.В., Иванов В.Е., Карп О.Е., Попова Н.Р., Усачева А.М., Черников А.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

e-mail: bruskov_vi@rambler.ru

Ранее в нашей лаборатории было показано образование активных форм кислорода (АФК) в водных растворах в присутствии растворенного кислорода под влиянием низкоинтенсивных тепловых и световых воздействий в результате сопряженных электрон-радикальных реакций [1]. В свою очередь, АФК приводят к окислительным повреждениям белков в клетках, как наиболее массового компонента, содержащего ряд легко окисляемых групп. Используя высокочувствительные хемилюминесцентные методы, показано образование долгоживущих окисленных радикальных форм различных белков (альбумина сыворотки быка (БСА), гамма глобулина, казеина и желатина) после рентгеновского излучения, тепловых (умеренной гипертермии) и световых воздействий (низкоинтенсивного излучения He-Ne лазера) в области резонансного поглощения молекулярного кислорода и переходом его в синглетное состояние. Впервые установлено, что образование окисленных белков индуцированное АФК приводит к формированию реактивных форм белков с временем полужизни около четырёх часов, способных в дальнейшем к длительной в течение нескольких часов генерации в растворах АФК (пероксида водорода, гидроксильных радикалов и других). При этом способностью к генерации H₂O₂ индуцированная теплом у гидролизата казеина значительно выше, чем у казеина. А эквимольная смесь аминокислот, соответствующая желатину, не приводит к генерации H₂O₂. Эти данные свидетельствуют об участии пептидной связи в образовании реактивных форм белков и пептидов H₂O₂. Рассмотрен возможный физико-химический механизм образования ДРФБ и генерация ими H₂O₂. Показана возможность существенной нейтрализации образования ОРФБ и генерации ими АФК *in vitro* и *in vivo* в случае окислительного стресса с помощью ряда природных биоантиоксидантов.

Таким образом, обнаружено новое, фундаментальное свойство белков и пептидов при наличии растворенного кислорода под действием умеренного нагревания и облучения He-Ne лазером переходить в состояние долгоживущих активных форм (ДАФБ), которые в течение длительного времени продуцируют АФК [2]. В настоящее время тепловые воздействия и лазерные излучения широко используются в практической медицине для лечения различных болезней с помощью физиотерапевтических процедур. Образование АФК долгоживущими реактивными формами белков и активация ими защитных клеточных механизмов может быть молекулярным механизмом их лечебного действия. Однако при значительной интенсивности этих воздействий это может приводить к продолжительному окислительному стрессу и после их окончания. Установлено, что образование окисленных реактивных форм белков происходит не только при физических воздействиях, но и в результате физико-химических окислительных процессов приводящих к образованию АФК под влиянием ионов уранила.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-44-03562-р_центр_а

1. Гудков, С.В., Иванов, В.Е., Карп, О.Э., и др., Биофизика, 2014, т. 59, вып. 5, сс. 862-870
2. Bruskov, V.I., Popova, N.R., Ivanov, V.E., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, vol. 443, pp. 957-961.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ МИКРОБНЫХ ЛИПАЗ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ РАСТВОРАХ СОЛЕЙ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ**Regulation of microbial lipase activity in micellar solutions of bile salts****Валиуллина Ю.А., Бакирова Д.Р., Богданова Л.Р.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31, а/я 30

Тел.: +7(843)292-62-88; e-mail: bogdanova.lilly@gmail.com

Липазы – многообразное семейство ферментов, которые гидролизуют гидрофобные субстраты и функционируют на границе раздела фаз. В регуляции их активности участвуют природные амфифилы - соли желчных кислот (СЖК). Это стероидные соединения, обладающие плоскостной амфифильностью и способностью солюбилизировать холестерин, пищевые липиды, а также жирорастворимые витамины.

В настоящей работе исследованы изменения структуры и каталитических свойств микробных липаз (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus*) в мицеллярных растворах ряда СЖК, отличающихся числом гидроксильных групп.

Методом динамического светорассеяния показано образование комплексов между мицеллами СЖК и ферментом. Оценка изменения структуры белка в комплексах проводилась взаимодополняющими методами кругового дихроизма и флуоресценции триптофановых остатков. Согласно данным, полученным методом кругового дихроизма, присутствие СЖК не оказывает существенного влияния на структуры исследованных ферментов: в липазах *Rh. miehei* и *M. javanicus* наблюдается незначительное уменьшение доли α -спиральных участков, влияние СЖК на липазу *C. rugosa* не выявлено. Разложение спектров суммарной флуоресценции на отдельные компоненты согласно модели дискретных состояний показало, что липаза *Rh. miehei* практически не претерпевает структурных изменений, а для липаз *C. rugosa* и *M. javanicus* в растворах СЖК наблюдается незначительный гипсохромный сдвиг максимума суммарной флуоресценции, вызванный перераспределением интенсивностей отдельных компонент.

Несмотря на незначительные структурные изменения ферментов, в растворах СЖК наблюдается существенное изменение их каталитических свойств. Показано, что в растворах СЖК происходит сдвиг температурного оптимума активности ферментов: для липаз *C. rugosa* и *M. javanicus* в сторону больших температур, для *R. miehei* – в сторону меньших. Определены кинетические параметры исследуемых реакций. Установлено, что по сравнению с буферным раствором в мицеллярных растворах СЖК происходит снижение эффективности катализа исследуемыми липазами, вызванное уменьшением сродства ферментов к субстрату и их активности. Установлено, что уменьшение сродства ферментов к субстрату связано с его солюбилизацией мицеллами СЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 14-03-31151 мол_а.

ФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МЕХАНИЗМА ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ АНАЛОГА АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА В ЗРИТЕЛЬНОМ РОДОПСИНЕ НА СВЕТУ ПРИ ДЕПРОТОНИРОВАНИИ АЗОТА ШИФФОВА ОСНОВАНИЯ

Physical model of mechanism of conformational change – similar allosteric effect in visual rhodopsin in the light at deprotonation nitrogen of the Schiff base

Васильева-Вашакмадзе Н.С.1, Тoidze П.Л.2, Лекишвили Г.Н.1, Гахокидзе Р.А.1

1-Тбилисский государственный университет им.И.Джавахишвили, 0179,Тбилиси, пр.Чавчавадзе, 1;

2–Тбилисский технический университет, 0175, Тбилиси, ул.Костава, 77

E-mail: nonavas@rambler.ru; pol-toidze@yandex.ru; nodar@lekishvili.info

Изучается механизм деформирования α -спиральной субъединицы опсина при депротонировании азота шиффова основания в освещенном родопсине. Применяется макроскопический и микроскопический подход. Депротонирование азота шиффова основания в родопсине сопровождается деформированием субъединицы опсина [1,2]. Изучение на макроскопическом уровне позволяет предположить, что механизм этого эффекта связан с особенностью α -спиральной белковой структуры – сильной взаимосвязью между электрической поляризуемостью и механической деформируемостью. В таких системах поляризация порождает механическую деформирующую силу [3]: $F(t) = kJ^2(t) \cdot l^{-2}(t)$ (1), где k - структурный коэффициент; $J(t)$ -поляризационный ток, $l(t)$ -длина α -спирального фрагмента. В рамках микроскопического подхода использовалась компьютерная программа квантово-химических расчетов HyperChem. Было показано, что депротонирование азота шиффова основания вызывает деформирование α -спиральной субъединицы опсина. Также показано, что применение квантовой механики в квазиклассическом приближении в первом порядке теории возмущений позволяет получить выражение для деформирующей силы, совпадающее с выражением (1), а поправки более высоких порядков вносят уточнения в классическую модель исследуемого молекулярного механизма.

1. Скулачев, В.П., Энергетика биологических мембран, М: Наука, 1989, 564 с.

2. Рубин, А.Б., Фотопревращения бактериородопсина и родопсина, Биофизика, т. 2, М: Наука, 2004, с. 87.

3. Васильева-Вашакмадзе, Н.С., Физические механизмы биологических процессов, Saarbrucken: LAP Lambert Acad Publishing, 2014, p. 96.

О ВНУТРЕННЕЙ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИМ, МЕЗОМЕРНЫМ И ИНДУКТИВНЫМ ЭФФЕКТАМИ В α -СПИРАЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ – АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТАХ, НЕКОТОРЫХ РЕЦЕПТОРАХ И БЕЛКАХ “МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН”**On the intrinsic relationship between allosteric, mesomeric and inductive effects in α -helical protein complex-allosteric enzymes, several receptors and protein “molecular machines”****Васильева-Вашакмадзе Н.С.**

Тбилисский гос. университет им. И. Джавахишвили, 0179, Тбилиси, пр. Чавчавадзе

Тел. (+99532)223-09-18; e-mail: nonavas@rambler.ru

В работе показано, что между аллостерическим, мезомерным и индуктивным эффектами, наблюдаемыми в аллостерических ферментах, α -спиральных белковых молекулах некоторых рецепторов и других белках “молекулярных машин” существует внутренняя взаимосвязь, которая является следствием квантово-механического принципа самосогласованного поля (ССП), свойственного молекулам и устойчивым молекулярным комплексам (с учетом особенностей строения α -спиральных фрагментов). Существует зависимость между энергией электронной подсистемы молекул (или молекулярных комплексов) и конфигурацией их ядерной подсистемы [1], которая может быть выражена в виде потенциальной поверхности в конфигурационном пространстве $W\{R_{kn}\}$ [2]. При этом, учет влияния внешних воздействий на систему отражается в виде искажения и смещения потенциальной поверхности в конфигурационном пространстве. Построив зависимость $W\{R_{kn}\}$, а также матрицу вторых производных $[W''(R_{kn}, R_{pq})]$ с учетом действия заряженных групп эффекторов (или заместителей) и сравнивая с соответствующим результатом для свободной системы, можно показать, что происходящий при этом сдвиг электронов вдоль π -электронных связей, т.е. мезоморфный эффект, как и сдвиг электронов вдоль σ -связей, т.е. индуктивный эффект – зависят от топологических особенностей исходной молекулы – конфигурации ядерной подсистемы (числа и взаимной ориентации фрагментов с π - и σ -связями). Вместе с тем, от этих же свойств зависит и деформируемость, т.е. выраженность аллостерического эффекта молекулы [3]. На основе применения вычислительных методов квантовой химии – программы HyperChem в работе приводятся результаты машинного эксперимента на конкретном примере, иллюстрирующем внутреннюю взаимосвязь между аллостерическим, мезомерным и индуктивным эффектами, имеющими место при воздействии ацетилхолина на ацетилхолиновый никотиновый нейрорецептор. В работе делается вывод, что в основе аллостерического, мезомерного и индуктивного эффектов, свойственного аллостерическим ферментам, некоторым рецепторам и т.д. лежит квантово-механический принцип самосогласованного поля (ССП).

1. Рубин, А.Б., Биофизика, Москва, Высш. Шк., т.2, 1987, сс. 298-350.

2. Флайгер, У., Строение и динамика молекул, М.: Мир, т. 1, 1982, 405 с.

3. Васильева-Вашакмадзе, Н., Физические механизмы биологических процессов, Saarbrücken: LAP Lambert Acad. Publishing, 2014, p. 100.

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОПЕПТИДА DIPPU AST3

Conformational analysis of the neuropeptide DIPPU AST3

Велиева Л.И. , Алиев Э.З. , Вагабова М.Р.

Бакинский Государственный Университет, ул. З.Халилова 23, AZ 1148, Баку, Азербайджан

E-mail: Lala_Veliyeva@rambler.ru

Проблема определения нативных конформаций нейропептидов относится к одной из актуальных в современной молекулярной биофизике, поскольку такие конформации являются в большинстве случаев основным фактором проявления их биологической активности. Несмотря на огромное разнообразие нейропептидных молекул, очевидно, что в основе молекулярных механизмов их сходной функциональной активности лежат одинаковые элементы пространственной организации.

В работе методом молекулярной механики в приближении атом-атомных потенциальных функций исследовано пространственное строение и конформационные свойства нейропептида из семейства аллатостатинов, содержащего в своей химической структуре восемь аминокислотных остатков Ser1-Lys2-Met3-Tyr4-Gly5-Phe6-Gly7-Leu8-NH₂ (SKMYGFGL) и получившего название Dippu AST3 [1-4]. Исследования основывались на минимизации энергии внутримолекулярных взаимодействий (невалентных, электростатических, торсионных) в окрестностях углов внутреннего вращения, соответствующих всем комбинациям стабильных конформаций монопептидных остатков, образующих молекулу [5-8]. Установлены десять энергетически стабильных конформаций нейропептида, реализуемых в условиях неявно заданного водного окружения, относительная конформационная энергия которых варьирует в интервале значений 0-10 ккал/моль. Показано, система водородных связей, несмотря на небольшой вклад в общую энергию молекулы, весьма важна для сохранения устойчивой структуры и ограничения подвижности аллатостатина Dippu AST3.

Согласно результатам исследования, основной вклад в стабилизацию низкоэнергетических конформаций молекулы вносят невалентные взаимодействия, вклад от которых варьирует в пределах -80÷-90 ккал/моль.

1. Pratt, G.E., Farnsworth, D.E., Siegel, N.R., Fok, K.F., and Feyereisen, R., Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, vol. 29, pp. 1243-1247.
2. Stay, B., Fairbairn, S., and Yu, C.G., Role of allatostatins in the regulation of juvenile hormone synthesis, *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 1996, vol. 32, nos. 3-4, pp. 287-297.
3. Woodhead, A.P., Stay, B., Seidel, S.L., Khan, M.A., and Tobe, S.S., Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 85, no. 15, pp. 5997-6001.
4. Woodhead, A.P., Klan, M.A., Stay, B., and Tobe, S.S., Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*, *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 1994, vol. 24, no. 3, pp. 257-263.
5. Popov, E.M., Quantitative approach to conformations of proteins, *Int. J. Quantum Chem.*, 1979, vol. 16, pp. 707-737.
6. Попов, Е.М., Структурная организация белков, М: Наука, 1989, 352 с.
7. Максумов, И.С., Исмаилова, Л. И., и Годжаев, Н. М., Программа полуэмпирического расчёта конформаций молекулярных комплексов на ЭВМ, *Журнал структурной химии*, 1983, т. 24, вып. 4, сс. 147-148.
8. Momany, F.A., McGuire, R.F., Burgess, A.W., and Scheraga, H.A., Energy parameters in polypeptides: Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interaction for naturally occurring amino acid *Phys. Chem.*, 1975, vol.79, pp. 2361-2381.

СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ АПО-ПАРВАЛЬБУМИНОВ НА ПРИМЕРЕ В-ПАРВАЛЬБУМИНА КИЖУЧА (ONCORHYNCHUS KISUTCH)**Structural stability of apo-parvalbumins: a case of β -parvalbumin from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)**

Вологжанникова А.А.1, Хорн П.А.1, Казаков А.С.1, Соколов А.С.1, Пермяков Е.А.1,2, Пермяков С.Е.1,2

1 – ФГБУН Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, 142290, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 7;

2 – ФГБОУ ВПО Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, г. Пущино, Московская обл., проспект Науки, 3

Тел.: +7(4967)31-89-65; факс: +7(4967)33-05-22; e-mail: lisiks.av@gmail.com

Парвальбумин (ПА) – небольшой глобулярный цитозольный кальцийсвязывающий белок, играющий роль буфера металлов в мышечном сокращении, широко используемый в качестве маркера специфических нейронов. ПА нашел применение в терапии сердечных заболеваний, а также является основным аллергеном рыб. Один из малоизученных структурных аспектов функционирования ПА – стабильность апо- (свободной от ионов металлов) формы белка. Апо-ПА обладает низкой структурной стабильностью, причем у некоторых из них отсутствует жесткая третичная структура. Проект посвящён изучению структурных свойств рекомбинантной формы ПА кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) (кПА), а также установлению закономерностей строения ПА, обуславливающих стабильность апо-формы белка. кПА нарабатывали в *E. coli* с последующим выделением, очисткой и характеризацией набором физико-химических и биохимических методов изучения белка. Согласно данным дифференциальной сканирующей калориметрии, апо-форма кПА демонстрирует отсутствие в диапазоне температур от 10°C до 130°C тепловых переходов типа «все-или-ничего», а также величины удельной теплоемкости, характерные для полностью развернутого белка. Потеря жесткой третичной структуры при переходе кПА в апо-форму сопровождается резким снижением устойчивости белка к химотрипсину. Экспонирование растворителю гидрофобных групп кПА при очистке от ионов кальция приводит к 8-кратному увеличению интенсивности флуоресценции бис-АНС, гидрофобного флуоресцентного зонда. Согласно данным метода динамического светорассеяния, отрыв ионов кальция от кПА сопровождается увеличением гидродинамического радиуса белка на 43%, причем метод химических сшивок белка свидетельствует об отсутствии ощутимых изменений на уровне четвертичной структуры белка. По данным метода кругового дихроизма, разворачивание структуры кПА в ответ на отрыв ионов кальция приводит к снижению содержания α -спиралей в белке на 32%. Полученные экспериментальные данные позволяют рассматривать апо-форму кПА в качестве внутренне неупорядоченного белка. Применение алгоритма PONDR® VSL2P для оценки вероятностей нахождения отдельных аминокислотных остатков в неупорядоченном участке белка показало, что ПА с отсутствием жесткой третичной структуры в апо-форме демонстрируют повышенную склонность к неупорядоченности в области N-концевого участка белка, включающего в себя спираль А, петлю АВ и N-концевую часть спирали В. Предложены критерии, позволяющие качественно предсказывать уровень структурной стабильности апо-формы ПА, на основе данных о его аминокислотной последовательности.

ЗЕЛЕНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК СПОСОБЕН "ЛОВИТЬ" И УДЕРЖИВАТЬ ВНУТРИ МОЛЕКУЛЫ РАСТВОРИТЕЛЯ

Green fluorescent protein is able to "catch" and hold inside the solvent molecules

Глухова К.А., Мельник Т.Н., Сурин А.К., Мельник Б.С.

Институт белка РАН, 142290, г. Пущино, Институтская, д. 4

E-mail: tmelnik@phys.protres.ru

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) имеет уникальную третичную структуру в виде бочонка, внешняя сторона которого образована одиннадцатью антипараллельными бета-тяжами. Хромофор находится внутри этой структуры, в середине α -спирали, проходящей вдоль оси бочонка. Исследователи, работающие с этим белком, сталкиваются с интересным фактом. На SDS-электрофорезе препарата белка присутствует одна полоса, соответствующая молекулярной массе этого белка. На гельэлектрофорезе в нативных условиях зеленый флуоресцентный белок «идет» двумя полосами, что интерпретируется наличием у белка двух изоформ. Чтобы понять, чем отличаются изоформы этого белка, мы исследовали GFP методами масспектрометрии и гельэлектрофореза в различных условиях. Также мы спроектировали и исследовали три мутантные формы этого белка с заменами остатков треонина в центральной альфа-спирали на валин. Мутациями нам удалось повлиять на образование изоформ GFP. Каждый из мутантных белков преимущественно находится в одной из изоформ. В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что, скорее всего, изоформы GFP отличаются между собой «пойманными» внутрь GFP-бочонка молекулами растворителя, возможно ионами солей.

Работа поддержана грантами РФФИ (13-04-00923 и 14-04-00925). Работа по созданию генноинженерных конструкций мутантных белков была проведена при поддержке РФФИ (грант №14-24-00157).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛА БЕЛКА VIRE2 ДЛЯ ГЕНОТЕРАПИИ**The research of the VirE2 protein potential for gene therapy application****Гусев Ю.С., Мазилев С.И., Моисеева Е.М., Волохина И.В., Чумаков М.И.**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Тел.: +7(8452) 97-04-03; e-mail: chumakov@ibppm.sgu.ru

Почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* способна переносить фрагмент Ti-плазмиды (одноцепочечной (оц) Т-ДНК) в ядро широкого круга растений и некоторых видов животных клеток в виде оцДНК-белкового комплекса. Показано, что один из агробактериальных белков вирулентности VirE2 участвует в нескольких важных для этого процесса функциях, в том числе, во взаимодействии с оцДНК, защите ее от нуклеаз, увеличения электропроводности мембран [1]. Одной из неисследованных функций агробактериального белка VirE2 может быть его в качестве пороформера для доставки таргетных последовательностей в животные клетки, что является новым подходом для генотерапии. Ранее мы показали, что рекомбинантный белок VirE2 способствует накоплению флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов (23 н.о.) в клетках HeLa и почек эмбрионов свиньи (СПЭВ) [2].

В данной работе мы пытались оценить вклад белка VirE2 и различных типов эндоцитоза в накопление оцДНК (200 н.о.) нативными клетками СПЭВ. Чтобы отделить возможную роль эндоцитоза в поглощении оцДНК, мы предварительно обработали клетки СПЭВ ингибиторами различных типов эндоцитоза (сахароза, цитохалазин, генистеин, хлорпромазин). Впервые показано, что оцДНК накапливается в клетках СПЭВ кавеолин-, клатрин-независимым путем, тогда как олигонуклеотиды (23 н.о.) накапливаются в клетках СПЭВ с участием клатрин-зависимого эндоцитоза. Установлено, что рекомбинантный белок VirE2 и при блокировке стимулирует накопление оцДНК (200 н.о.) клетками СПЭВ.

С помощью компьютерных методов установлено, что модели комплексов, состоящие из двух и четырех индивидуальных белков VirE2, способны встраиваться в мембрану. В комплексах из двух и четырех индивидуальных белков VirE2 нами ранее обнаружены поры с диаметром канала 1.2-1.6 и 1.4-4.6 нм соответственно [2]. В докладе представлены данные о свойствах пор из двух и четырёх белков VirE2, полученные с помощью метода нормальных мод. Также проведено моделирование молекулярной динамики комплекса из белков VirE2 и VirE1, а также комплекса двух белков VirE2. Показано, что комплексы в исследованных временных интервалах стабильны, а белок-шаперон VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 14-04-31206 мол_а.

1. Чумаков, М.И., Мазилев, С.И., и др., Биомембраны, 2010, т. 27, вып. 5, сс. 449-454.
2. Volokhina, I.V., Gusev, Yu.S., et al., J. Bioinf. Comput. Biol., 2012, vol. 10, p. e1241009.

СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКА КОМПЛЕКСОВ ИЗ БЕЛКА VIRE2

The structures and dynamic of complexes from VirE2 protein

Гусев Ю.С., Мазилев С.И., Волохина И.В., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049, Россия
тел.: (8452) 970403, e-mail: chumakov@ibppm.sgu.ru

Почвенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* вызывают раковые образования у растений, встраивая одноцепочечный фрагмент Ti-плазмиды (Т-ДНК) агробактерий в растительный геном с последующей экспрессией бактериальных генов, кодирующих гормоны в клетке-реципиенте. Бактериальный белок VirE2 выполняет при этом несколько функций: связывание с Т-ДНК, ее защиту от деградации растительными эндонуклеазами, и, предположительно, транспорт Т-ДНК через растительные и искусственные мембраны [1, 2]. Целью работы является анализ методами биоинформатики структуры и свойств комплексов из белка VirE2. С помощью метода нормальных мод программой Elnemo (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/elneemo/index.html>) установлено, что модель комплекса из белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при времени моделирования до 500 пс, при этом белок-шаперон VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью. В комплексе VirE2-VirE1 белков обнаружены глобальные движения доменов в 1, 2 и 3-х модах. С помощью CHARMM-GUI Membrane Builder (<http://www.charmm-gui.org/>) показано, что комплекс VirE2-VirE1 может встраиваться в мембрану, но у VirE2 белка отсутствуют каналы, достаточные для прохождения оцДНК, хотя имеется три канала диаметром 0.2, 0.3 и 0.8 нм, обнаруженные с помощью программы Mole (<http://mole.chemi.muni.cz/web>). Вероятно, для формирования пор из белка VirE2, достаточных для прохождения оцДНК с пилотирующим белком необходимы комплексы из нескольких субъединиц VirE2. Так, в комплексе из двух белков VirE2, построенном с помощью GRAMM-X (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu>), возможно образование канала диаметром 1.2-1.6 нм [3], в просвете которого экспонированы концы подвижной междоменной петли (аминокислотные остатки 341-345). Этого диаметра достаточно для прохождения коротких олигонуклеотидов через пору из двух субъединиц, но не достаточно для прохождения оцДНК с пилотирующим белком VirD2, расчетный гидродинамический диаметр которого составляет 3.4 нм. Канал диаметром до 4.6 нм, по оценке, проведенной с помощью программы Mole, может существовать в комплексе из четырех субъединиц VirE2.

С помощью метода нормальных мод оценены колебательные движения у модели комплексов из белков VirE2-VirE1, из двух и четырех субъединиц VirE2. В комплексе из двух субъединиц VirE2 обнаружены колебательные движения, похожие на открывание-закрывание канала воротного механизма, аналогичного механизму в ионных каналах. Среди колебаний в комплексе из четырех субъединиц белка VirE2 не обнаружены изменения конформации внутри поры. Среди построенных нами комплексов из шести субъединиц белка VirE2 не было найдено структур с каналами, которые удовлетворяли бы условиям переноса оцДНК.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ №№ 14-04-31206 мол_а.

1. Dumas, F., Duckley, M., et al., PNAS USA, 2001, vol. 98, pp. 485-490.
2. Чумаков, М.И., Мазилев, С.И., и др., Биомембраны, 2010, т. 27, вып. 5, сс. 449-454.
3. Volokhina, I.V., Gusev, Yu.S., et al., J. Bioinf. Comput. Biol., 2012, vol. 10, p. 1241009.

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛАМИНА И ЕГО ЛИЗОПРОИЗВОДНЫХ НА КОНФОРМАЦИЮ ОМРФ-ПОДОБНОГО ПОРИНА YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS**Influence of phosphatidylethanolamine and saturated and unsaturated lysophosphatidylethanolamines on conformation of OmpF-like porin from Yersinia pseudotuberculosis**

Давыдова Л. А.1, Санина Н. М.1, Бахолдина С. И.2, Веланский П. В.1, Новикова О.Д.2, Порнягина О.Ю.2, Шныров В.Л.3

1 – Дальневосточный федеральный университет, 690091 г. Владивосток, ул. Суханова, 8;
2 – Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отд. РАН, 690022, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку, 159
e-mail: davydova.la@dvfu.ru

Известно, что адаптационные физико-химические изменения в липидном матрикс мембран призваны обеспечивать нормальное функционирование мембранных белков в изменяющихся условиях окружающей среды, но роль различных липидов в процессах адаптации пока изучена слабо. Наши предыдущие исследования показали, что под действием фенола происходит значительное накопление лизофосфатидилэтанолamina (ЛФЭ) в клетках *Yersinia pseudotuberculosis* [1]. Сравнение эффектов различного содержания ЛФЭ в общих липидах, полученных из нативных и обработанных фенолом клеток, на конформацию ОmpF-подобного порина из этой же бактерии (YOmpF) показало, что 2,5-кратное увеличение содержания ЛФЭ повышает термостабильность белка. Однако лизолипиды обычно принято рассматривать в качестве детергентов, дестабилизирующих структуру мембраны. Поэтому целью настоящей работы было выяснить, какая форма ЛФЭ (насыщенная или ненасыщенная) преимущественно накапливается в мембранах бактерий в ответ на стресс, и сравнить эффекты фосфатидилэтанолamina (ФЭ) и его насыщенного (лизопальмитоилфосфатидилэтанолamin – ЛПФЭ) и ненасыщенного (лизоолеоилфосфатидилэтанолamin – ЛОФЭ) производных на конформацию порина. Было показано, что при стрессе в клетках *Y. pseudotuberculosis* преимущественно аккумулируется ненасыщенная форма ЛФЭ (50% против 15% насыщенного ЛФЭ). Согласно полученным результатам калориметрических исследований дипальмитоилфосфатидилэтанолamin (ДПФЭ) и, особенно, ЛОФЭ повышают устойчивость порина к термоденатурации, в то время как ЛПФЭ оказывает противоположный эффект. Деконволюция экспериментальных спектров собственной флуоресценции порина показала, что различный эффект липидов на термостабильность порина обусловлен влиянием этих липидов на третичную структуру белка. Вероятно, ДПФЭ и, особенно ЛОФЭ, повышают связь мономеров в тримере порина в отличие от ЛПФЭ.

Различный эффект исследуемых липидов может быть связан с формой их молекул. ДПФЭ, имеющий форму цилиндра, формирует планарный бислой. Обратноконические молекулы ЛПФЭ формируют сферические мицеллы [2]. Молекулы ЛОФЭ из-за наличия двойной связи приближаются по форме к цилиндру и поэтому, вероятно, образуют промежуточную структуру – плоскую мицеллу, содержащую участок бислоя с положительной кривизной, что может способствовать даже большему, чем в планарном бислое ДПФЭ, уплотнению структуры порина [3].

1. Sanina, N., Davydova, L., Bakholdina, S., Novikova, O., Pornyagina, O., Soloveva, T., Shnyrov, V., and Bogdanov, M., Effect of phenol-induced changes in lipid composition on conformation of OmpF-like porin of *Yersinia pseudotuberculosis*, FEBS Letters, 2013, vol. 587, pp. 2260-2265.
2. Israelachvili, J., Intermolecular and surface forces, London: Academic Press, 1992, p. 450.
3. Brown, M.F., Curvature forces in membrane lipid-protein interactions, Biochemistry, 2012, vol. 51, pp. 9782-9795.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект №15-15-00035).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖЕСТКОСТИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ И ЕЕ АНАЛОГОВ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОГО И БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПОДХОДОВ

Active site rigidity of bacterial luciferase and its analogues: a comparative analysis with methods of molecular dynamics and bioinformatics

Деева А.А.1, Суковатый Л.А.1, Темлякова Е.А.2, Немцева Е.В.1,3, Кратасюк В.А.1,3

1 – Сибирский федеральный университет, 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79

2 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3

3 – Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, ул. Академгородок, 50, стр. 50

Тел.: +7(391)206-207-2; факс: +7(391)206-21-65; e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru

Поиск структурных особенностей белковых макромолекул, обеспечивающих эффективное выполнение ими биологической функции, является важной задачей современной молекулярной биофизики. Наиболее эффективным подходом при этом считается анализ трехмерных структур, обладающих, как правило, большей консервативностью по сравнению с первичной последовательностью.

Флаavin-зависимые монооксигеназы представляют собой широко распространённый класс ферментов, катализирующих реакцию, в которой один из атомов молекулы кислорода идет на окисление органического субстрата, в то время как второй участвует в образовании молекулы воды [1]. Одним из таких ферментов является бактериальная люцифераза (B_{Luc}). Её пространственная структура обеспечивает уникальное свойство данного фермента – способность катализировать превращение энергии химической реакции в свет. Способность катализировать светоизлучение отличает люциферазу от ее аналогов: алкансульфонат монооксигеназы *Escherichia coli* (SsuD) и длинноцепочечной алкан монооксигеназы *Geobacillus thermodenitrificans* (LadA). Предположительно, именно особенности структуры бактериальной люциферазы позволяют минимизировать безызлучательные пути дезактивации возбужденного состояния продукта реакции. Целью данной работы было установление структурных отличий, обеспечивающих повышенную жесткость активного центра бактериальной люциферазы, по сравнению с ее аналогами.

В качестве объекта исследования использовали кристаллические структуры B_{Luc} (PDB ID: 3FGC), SsuD (PDB ID: 1M41) и LadA (PDB ID: 3B9N). Для определения жесткости белковых структур проводили молекулярно-динамические расчеты с помощью программного пакета NAMD. Поведение системы моделировали в течение 2·10⁵ фс в условиях канонического ансамбля (1 атм, 310 К). Подвижность аминокислотных остатков оценивали по среднеквадратичной флуктуации C α атомов [2]. Сравнение белковых структур проводили с помощью плагина MultiSeq программного пакета VMD.

Было обнаружено, что подвижность аминокислотных остатков бактериальной люциферазы, участвующих в связывании флавина, (диапазон 43-110 а.о.), сравнима или больше, чем у исследованных монооксигеназ. Также аминокислотные остатки активного центра люциферазы из диапазона 160-300 а.о., в целом, характеризуются меньшей подвижностью по сравнению с соответствующими участками монооксигеназ. Это указывает на возможную роль данного участка в стабилизации возбужденного интермедиата биолюминесцентной реакции.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» и Министерства образования и науки РФ (государственное задание на выполнение работ, проект №1762).

1. Huijbers, M.M., Montersino, S., et al., Arch. of Biochem. and Biophys., 2014, vol. 544, pp. 2-17.
2. Kamal, Z. and Mohammad, T.A., Plos One, 2012, vol.7, pp. 1-8.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРРЕДОКСИНА, ФНР И ГИДРОГЕНАЗЫ МЕТОДОМ МНОГОЧАСТИЧНОЙ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ**Simulation of the interaction of ferredoxin, FNR and hydrogenase brownian using many-body Brownian dynamics method**

Дьяконова А.Н., Хрущев С.С., Ризниченко Г.Ю.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра биофизики, Москва, 119234, Ленинские горы, д.1, стр. 24

E-mail: alex.diakonova@gmail.com

В строме хлоропластов в процессе фотосинтетического электронного транспорта ферредоксин забирает электроны от фотосистемы I (ФСI) и передает их на ферредоксин-НАДФН-редуктазу (ФНР), которая, в свою очередь, восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФН. НАДФН затем используется в реакциях фиксации углерода. В некоторых организмах, включая цианобактерии и зеленые водоросли, в тилакоидах содержится фермент гидрогеназа, восстанавливающий протоны до молекулярного водорода с использованием электронов ферредоксина. Молекулярный водород может служить биотопливом, и разработка методов его получения при помощи микроорганизмов является важным направлением биоэнергетики.

В настоящее время одним из важных объектов для получения биоводорода является зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. Было показано, что в анаэробных условиях *Chlamydomonas* выделяет молекулярный водород. Оказалось, что в отсутствие кислорода синтезируется фермент гидрогеназа, и на него начинается поток электронов с ФСI через ферредоксин, но при этом другие белки, получающие электроны от ферредоксина в системе остаются, конкурируя с гидрогеназой за общий восстановитель.

Основным конкурентом гидрогеназы в строме хлоропластов является ФНР. В экспериментах по исследованию выхода водорода в системе, состоящей из ФСI, ферредоксина, ФНР и гидрогеназы, и в выделенных тилакоидах в реакционном буфере с pH 7,4 было показано, что опосредованное ФНР восстановление НАДФН лимитирует выделение водорода.

Нами была построена конкурентная модель взаимодействия ферредоксина, ФНР и гидрогеназы, в которой молекулы трех типов белков помещались в кубический реакционный объем, где они двигались за счет броуновской и электростатической сил, создаваемых соседними молекулами и раствором. Мы исследовали, как изменение pH влияет на распределение электронных потоков с ферредоксина, то есть с каким из белков-партнеров ферредоксин предпочтительно взаимодействует при разных значениях pH.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ ДЕФЕНЗИНОВ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Structure of antimicrobial proteins by computational modeling

Ермакова Е.А., Файзуллин Д.А., Хайрутдинов Б.И., Идиятуллин Б.З., Зувев Ю.Ф

Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31

Tel. (+7) 843-231-9037; Fax: (+7) 843-292-7347; Email: ermakova@kibb.knc.ru

Антимикробные пептиды являются важным компонентом иммунной системы и вызывают значительный интерес как новый потенциальный класс природных антибиотиков и иммунорегулирующих соединений. Растительные дефензины – небольшие, положительно заряженные белки, демонстрируют активность против широкого класса патогенов, включая бактерии, грибы, вирусы. В то же время, структура и функции растительных дефензинов мало изучены.

В данной работе методы структурного моделирования с применением программ Geno3D, SWISS-MODEL, I-TASSER, Phyre, FUGUE и молекулярного докинга (с использованием программы HADDOCK) были применены для моделирования трехмерной структуры растительного дефензина сосны и для исследования его олигомерного состояния.

Сравнение полученной структуры дефензина сосны со структурами других растительных дефензинов подтверждает тот факт, что, несмотря на большое разнообразие аминокислотных последовательностей, характерное для дефензинов, растительные дефензины консервативны по своей вторичной и третичной структуре. Сравнение модельных и экспериментальных структур показало, что все использованные методы предсказывают структуру белка с удовлетворительной точностью и могут быть использованы для изучения структуры других дефензинов.

Методом молекулярного докинга было показано, что дефензины образуют устойчивые димеры. Сольватационный эффект и Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие дают благоприятный вклад в межмолекулярную энергию взаимодействия, в то же время наибольший вклад в межмолекулярное взаимодействие дает электростатическое взаимодействие, несмотря на сильный положительный заряд белков.

Показано, что растительные дефензины могут образовывать 4 различных типа димеров. Проведено сравнение предсказанных структур димеров с известными олигомерными состояниями растительных дефензинов и дефензинов человека.

Методом Gaussian network model проанализировано изменение внутримолекулярной подвижности белка при образовании димеров различного типа.

Образование димеров и олигомеров более высокого порядка приводит к перераспределению электростатического потенциала на поверхности белка и к изменению подвижности функционально значимых аминокислотных остатков, которые, в основном, расположены на петлях/неструктурированных участках белка, что может привести к изменению активности белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта №_15-44-02309.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ «Ж-Н» КОНФИГУРАЦИИ АЛЬФА-МАКРОГЛОБУЛИНОВ КРОВИ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПРОТЕАЗАМИ, ЛИГАНДАМИ, КЛЕТОЧНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ**Conformation of «Ж-Н» forms of plasma alpha-macroglobulin molecules in processes its interaction with proteases, ligands and cellular receptor complex****Ермолаев В.И., Савина М.А., Юдин Н.С., Айтназаров Р.Б.**Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10
e-mail: ermolaev@bionet.nsc.ru

Альфа-макроглобулины (АМ) представлены в крови животных металло-глико-липо-протеинами молекулярной массой 720 КД. Его основу образуют четыре идентичных полипептидных цепи протяженностью примерно 1450 аминокислотных остатков. Необходимыми структурными компонентами нативных молекул АМ являются ионы цинка для взаимодействия димеров, углеводы и небольшое количество жирных кислот. Основной известной функцией этого семейства белков является ингибирование активностей сериновых протеаз. Есть данные о том, что они участвуют в транспорте и функционировании более 20 других лигандов разной структуры. В процессе взаимодействия с протеазами каждая полипептидная цепь претерпевает несколько стадий конформационных превращений, из которых наиболее изученным являются следующие. В середине полипептидной цепи (bait region – область приманки), происходит гидролиз-разрыв протеаза-чувствительных сайтов. Далее сигнал передается к домену ТЭС - тиоэфирной связи и происходит ковалентная фиксация протеазы по остаткам лизина. При этом С-концевой домен выставляется на поверхность глобулы АМ в виде сигнальной метки. Этот фрагмент взаимодействует с рецепторами AMR клеточных поверхностей, и весь комплекс АМ-протеаза эндцитируется. Процесс превращения молекул АМ из нативной Ж-образной формы в более компактную Н-форму имеет дозо-зависимый характер. Электронно-фотографические проекции изображения этих двух крайних состояний принято обозначать символом «Ж» русского алфавита и символом «Н» латинского (Delain et al., 1992). АМ являются самым главным антитромбозным фактором противосвертывающей системы крови. Каждая молекула-протеаза, попадающая в кровоток, практически мгновенно захватывается АМ и эндцитируется. У разных видов млекопитающих семейство АМ-белков представлено разным числом вариантов, как на геномном, так и на протеомном уровне. Есть основания считать, что генетические варианты могут различаться по конформационно-пространственным характеристикам и по-разному взаимодействовать с протеазами и лигандами.

1. Yermolaev, V.I., et al., Study of swine alpha-macroglobulin gene-family polymorphism in the context of some problems of animal breeding, Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 225-232.
2. Yermolaev, V.I., et al., Selection for behavior and correlation with the Macroglobuline and Lipoproteine systems in the American mink (Neovison vison), Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014, vol. 4, no. 6, pp. 479-482.

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИГЛУТАМИНОВОГО ТРАКТА АТАКСИНА-3

Structural Features of the Ataxin-3 Polyglutamine Tract

Жемков В.А.1,2, Кульминская А.А.1,2, Безпрозванный И.Б.2,3, Ким М.В.2,3

1 – Лаборатория молекулярной нейродегенерации, ФГАОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет», 195251, Россия, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29;

2 – Лаборатория энзимологии, НИЦ «Курчатовский институт» Петербургский институт ядерной физики, 188300, Россия, Гатчина, Орлова Роща;

3 – Отдел физиологии, Юго-западный медицинский центр университета Техаса, 75390, США, Даллас, бул. Гарри Хайнс, 5323.

Тел.: +7(812)297-31-69; e-mail: vladimirzhemkov.edu@gmail.com

Спиномозжечковая атаксия 3 типа (СМА3), или болезнь Мачадо-Джозефа – тяжелое нейродегенеративное заболевание головного мозга, которое относится к группе полиглутаминовых болезней [1]. Эта группа заболеваний связана с экспансией триплета CAG в соответствующих генах, что на белковом уровне приводит к удлинению полиглутаминового тракта (polyQ). В тех случаях, когда длина этой последовательности превышает некоторое критическое значение, мутация приводит к развитию заболевания.

В случае СМА3 экспансия наблюдается для белка атаксина-3, в котором полиглутаминовый тракт расположен в С-концевом домене [1]. Знание атомной структуры polyQ необходимо как для понимания его функции в клетке, так и для понимания молекулярных основ развития polyQ-заболеваний. Тем не менее, в настоящее время структуры polyQ околотоатомного разрешения (3.6 Å и ниже) в контексте белка известны лишь для участка хантингина [2, 3]; а также для изолированного пептида 11Q (1.6 Å) в комплексе с антителом, выработанным против полиглутамина [4].

В данной работе кристаллические структуры С-концевого участка белка атаксина-3, содержащего polyQ тракт длиной 14Q (278-329 а.к.о.), были определены с разрешением 2.2 Å. Наблюдались две различные конформации полиглутамина: развернутая петля и альфа-спираль, что согласуется с кристаллическими структурами хантингина [2, 3]. В структуре полиглутаминовой альфа-спирали были локализованы сети водородных связей, образованных боковыми цепями остатков глутамина. Наличие межостаточных водородных связей указывает на аномально высокую стабильность подобной альфа-спиральной структуры, имеющей два «слоя» водородных связей.

Впервые полученная трехмерная структура С-концевого участка атаксина-3 высокого разрешения имеет большое значение не только в контексте спиномозжечковой атаксии 3, но и всех полиглутаминовых болезней.

Работа выполняется при поддержке грантов: Российского Научного Фонда, договор 14-25-00024 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» – соглашение №14.В37.21.0121, соглашение №14.В37.21.0219.

1. Almeida, B., Fernandes, S., Abreu, I., and Macedo-Ribeiro, S., Trinucleotide repeats: a structural perspective, *Frontiers in Neurology*, 2013, vol. 4, p. 76.
2. Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z., and Bezprozvanny, I., Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region, *Structure*, 2009, vol. 17, pp. 1205-1212.
3. Kim, M., Beta conformation of polyglutamine track revealed by a crystal structure of Huntingtin N-terminal region with insertion of three histidine residues, *Prion*, 2013, vol. 7, pp. 221-228.
4. Li, P., Huey-Tubman, K.E., Gao, T., Li, X., West, A.P., Bennett, M.J., and Bjorkman, P.J., The structure of a polyQ-anti-polyQ complex reveals binding according to a linear lattice model, *Nature structural & molecular biology*, 2007, vol. 14, pp. 381-387.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ ТИРОЗИНКИНАЗ СЕМЕЙСТВА ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА**In silico modeling of transmembrane domains of insulin receptor tyrosine kinase family****Замалетдинов М.Ф.1,2, Кузнецов А.С.1, Ефремов Р.Г.1,3**

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1; 3 – Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20

Тел.: +7(926)182-36-75; e-mail: miftakhz@gmail.com

Изучение белков, входящих в семейство инсулинового рецептора, является важным для медицины, так как их дисфункция приводит к развитию множества заболеваний: раку, диабету II типа и различным нарушениям развития. Трансмембранный (ТМ) домен участвует в процессе активации рецепторных тирозинкиназ [1], и его изучение поможет понять механизм активации и повлиять на него. Для рецепторов инсулина и инсулинподобного фактора роста 1 в настоящий момент предложены две модели активации, предполагающие различное состояние ТМ-домена в активном состоянии: димеризованное [2], либо свободное, в котором домены не взаимодействуют [3]. Получение данных об ассоциации мембранных белков экспериментальными методами затруднено, поэтому в данной работе был использован метод компьютерного моделирования.

В настоящей работе были построены модели димеров ТМ-доменов рецепторов инсулина и инсулинподобного фактора роста 1, проведен анализ их стабильности с помощью метода молекулярной динамики в явно заданном липидном бислое и рассчитаны зависимости потенциала средних сил от расстояния между центрами масс альфа-спиралей, на основании которых выполнены количественные оценки свободной энергии димеризации ТМ-сегментов. В результате показано, что наиболее выгодные модели димеров двух изучаемых рецепторов обладают схожими геометрическими параметрами: углом скрещивания и расстоянием между альфа-спиральями. Таким образом, можно предположить, что механизм активации может быть одинаковым, несмотря на значительные отличия в аминокислотной последовательности ТМ-доменов этих белков. Данный вывод открывает путь для обсуждения роли отдельных аминокислотных остатков в димеризации ТМ-доменов. Разработанная методика в перспективе позволит изучить влияние известных мутаций на димеризацию этих рецепторов на атомарном уровне и провести сравнение их поведения в патологических состояниях.

1. Li, E. and Hristova, K., Cell Adhesion & Migration, 2010, vol. 4, pp. 249-254.
2. Kavran, J.M. and McCabe, J.M., et. al., Elife, 2014, vol. 3, p. e03772.
3. Lee, J., Miyazaki, M., et. al., J Biol Chem, 2014, vol. 289, pp. 19769-19777.

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИБРИНОГЕНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ. МЕТОД ЯМР-ДИФFUЗОМЕТРИИ

NMR self-diffusion and hydrodynamics of fibrinogen in water solutions

***Зуев Ю.Ф.1, Ситницкий А.Э.1, Идиятуллин Б.З.1, Бакирова Д.Р.1, Литвинов Р.И.2,3,
Galanakis D.K.4, Weisel J.W.3***

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 30

2 – Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, 420012, Казань, ул. Карла Маркса, 74

3 – Department of Cell and Developmental Biology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

4 – SUNY at Stony Brook School of Medicine, Stony Brook, NY, USA

Тел.: +7(843)231-90-36; e-mail: yufzuev@mail.ru

Фибриноген – мультидоменный белок плазмы крови, который, согласно данным рентгеноструктурного анализа, имеет палочкообразную форму примерно 45 нм в длину и 3-6 нм в поперечнике. По концам молекулы находятся глобулярные структуры, называемые β - и γ -узелками; еще одна маленькая глобула (центральный узелок) находится в ее середине. Центральная и периферические глобулы соединены двумя суперспиральными участками, каждый из которых образован тремя α -спиралями, скрученными наподобие каната. Кроме того, в молекуле фибриногена имеются почти не структурированные, подвижные С-концевые участки А α цепей (α С регионы), экспонированные в растворитель и физиологически важные для образования фибриновых сгустков. В этой связи молекулярные характеристики фибриногена, особенно в условиях межмолекулярных взаимодействий, имеют фундаментальное биологическое значение.

В настоящей работе методом ЯМР (Bruker AVANCE III 600 MHz) исследовано диффузионное поведение фибриногена, выделенного из плазмы крови человека и крупного рогатого скота, в интервале концентраций 0.3-60 мг/мл и температур $T=278-315$ К. Обнаружено существенное отличие концентрационной зависимости коэффициента самодиффузии фибриногена от поведения частиц сфероидальной формы. Полученная зависимость хорошо описывается растянутой экспонентой, часто используемой для молекулярных систем со значительными межмолекулярными взаимодействиями. Заметное межмолекулярное взаимодействие в концентрированных растворах фибриногена фиксируется также по существенному увеличению энергии активации диффузионной подвижности белка при увеличении его объемной доли в растворе. Исследования самодиффузии «укороченного» фибриногена I-9, в котором отсутствуют выступающие α С регионы, подтверждает наше предположение, что ассоциация полноразмерного белка происходит за счет взаимодействия неструктурированных участков А α цепей. Полученные результаты подтверждают, что в растворе молекулы фибриногена сохраняют палочкообразную форму, взаимодействуя друг с другом посредством подвижных неструктурированных α С регионов.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 15-44-02230.

ХИРАЛЬНЫЙ КАРКАС БИОМОЛЕКУЛ

Chiral basement of biomolecules

Ильченко С.А., Малышко Е.В., Скурида В.Д., Твердислов В.А.

МГУ имени М.В.Ломоносова, 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 2, физический факультет, кафедра биофизики

Тел.: +7(495)939-11-95;; e-mail: st.ilchenko93@gmail.com; katyamalyshko@mail.ru; vasily.skurida@yandex.ru; tverdislov@mail.ru

Работа направлена на развитие модели, посвященной иерархическому структурообразованию в биомакромолекулах. Ранее в структурных иерархиях ДНК и белков были выявлены знакопеременные хиральные уровни: от «нижнего» ассиметричного атома углерода до спиралей, суперспиралей и надмолекулярных структур. Отмечено чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК, а также смена знака хиральности L-D-L-D в белковых структурах. Убедительное доказательство правила смены знака хиральности при переходе к следующему структурному уровню получено нами на основании анализа более 1000 белковых структур по базам данных. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдалось внутримолекулярное перекрытие α -спиралей (coiled-coil structure), отмечена тенденция свивания их в левую суперспираль. Выполнена систематизация иерархий, отражающих обсуждаемую закономерность в надмолекулярных структурах на примере фибриллярных белков: актиновой протофибрилле, миозине, α -кератине, тропомиозине, парамиозине и легкой цепи меромиозина. Таким образом, можно считать обоснованным высказанное нами ранее утверждение о закономерной смене знака хиральности как общей физической закономерности при переходе от вторичной к третичной структуре и выше. Рассмотрены термодинамические подходы к описанию формирования знакопеременных хиральных иерархий, а также механические критерии устойчивости винтовых пружин (как моделей молекулярных спиралей) на основании модели Эйлера.

Проводя сравнение молекулярных структур, связанных с хиральностью, в живой природе и неживой, мы опять-таки смогли проследить ту же общую физическую закономерность. Так, молекулы ТФААС как хиральные биомиметики, холестерические жидкие кристаллы образуют, подобно *Paenibacillus vortex* colony и колонии амёб *Dictyostelium discoideum*, хиральные паттерны. Холестерические жидкие кристаллы представляют собой модельные конструкции из хиральных молекул. Хиральность молекул приводит к закрутке и пространственной модуляции жидкокристаллических фаз, поэтому следующий слой поворачивается на небольшой угол. В качестве хиральных молекул обычно используют производные холестерина: ментол, изоамиловый спирт и другие соединения. Известно, что ментол левый, а межслойная спираль образует правый винт.

Разумно предположить, что спиральные структуры необходимы не только как жесткие конструкции для реализации выделенных поступательных механических степеней свободы, но и как вентильные устройства для обеспечения однонаправленного циклического движения молекулярных машин, реализующих вращательные степени свободы.

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА 11 С БЕЛКОМ S100P

Calcium-dependent interaction of interleukin-11 with S100P protein

Казаков А.С.1, Соколов А.С.1, Растрьгина В.А.1, Исмаилов Р.И.1, Михайлов Р.В.2, Улитин А.Б.2, Мирзабеков Т.А.2, Пермяков Е.А.1, Пермяков С.Е.1

1 – ФГБУН Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 7

2 – ООО «Антерикс», 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 7
Тел.: +7(4967)31-89-72; факс: +7(4967)33-05-22; e-mail: fenixfly@yandex.ru

Интерлейкин 11 (IL-11) – цитокин семейства IL-6, вырабатываемый стромальными клетками костного мозга и лимфоидных органов, оказывающий стимулирующее влияние на предшественников гемопоэза, В-лимфоцитов и остеокластов. Уровень экспрессии IL-11 повышен в большинстве желудочно-кишечных карцином, при раке молочной железы и печени, причем уровень IL-11 коррелирует со степенью тяжести протекания заболевания. Онкогенное действие IL-11 опосредовано образованием гетеротримерного комплекса белка с его рецептором IL-11R α , а также рецептором gp130. S100P – небольшой глобулярный кальцийсвязывающий белок, экспрессируемый в плаценте, пищеводе, желудке, двенадцатиперстной кишке, толстом кишечнике, простате и лейкоцитах. Экспрессия белка S100P повышена при раке желудка, поджелудочной железы, толстой кишки, молочной железы, простаты, яичников, легкого, меланоме, при этом уровень белка S100P коррелирует со степенью тяжести протекания заболевания. Один из путей онкогенного действия белка S100P опосредован взаимодействием его секретированной формы с RAGE-рецептором. Настоящий проект нацелен на изучение взаимодействия между IL-11 и белком S100P человека в условиях *in vitro*, в связи с участием внеклеточных форм обоих белков в развитие онкозаболеваний желудочно-кишечного тракта и рака молочной железы. Нами получены рекомбинантные формы IL-11, внеклеточного домена рецептора IL-11R α (sIL-11R α) и белка S100P. Методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) обнаружено взаимодействие IL-11, иммобилизованного на поверхности чипа через аминокислотные группы, с кальцийсвязанной формой белка S100P. Замена ионов кальция на магний приводит к исчезновению взаимодействия. Селективность взаимодействия между IL-11 и белком S100P подтвердили аналогичными экспериментами, выполненными с родственным S100P белком, α -парвальбумином крысы. Величины равновесных констант диссоциации комплекса IL-11 – S100P, полученные при анализе кинетических данных метода ППР в рамках модели гетерогенного лиганда (IL-11), составили 32 нМ и 288 нМ. Величины аналогичных констант для комплекса между IL-11 и sIL-11R α составили 7 нМ и 22 нМ. Наличие взаимодействия между IL-11 и белком S100P было подтверждено методом иммуноферментного анализа. Спектрофлуориметрическое титрование интактной формы IL-11 раствором S100P, отслеживаемое по триптофановой флуоресценции IL-11, подтвердило наличие в молекуле IL-11, по меньшей мере, двух центров связывания S100P. Данные метода химических сшивок свидетельствуют об образовании комплекса IL-11 – S100P с соотношением молекул 1:1, а также комплексов более высокого порядка. Учитывая близость констант диссоциации комплекса к витальным концентрациям IL-11 и S100P в крови, обнаруженное специфическое и селективное взаимодействие IL-11 с белком S100P может иметь физиологическое значение как в норме, так и при онкогенезе.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ (№14.607.21.0097, RFMEFI60714X0097).

ЗАКОНОМЕРНОСТИ В СТРУКТУРАХ И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ВАВ-ЕДИНИЦ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ**Structural and amino acid sequence pattern in the $\beta\alpha\beta$ -units of globular proteins*****Каргатов А.М., Бражников Е.В.***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук (ИБ РАН), 142290 г. Пущино, Московской обл., ул. Институтская, 4
Тел.: +7(4967)318-440; e-mail: tefg@vega.protres.ru; kargatov@rambler.ru

$\beta\alpha\beta$ -Единица является одним из самых распространённых структурных мотивов в белках. Она состоит из двух взаимодействующих β -тяжей и соединяющей их α -спирали, которые лежат в параллельных слоях и закручивают полипептидную цепь в правую суперспираль. Часто между этими β -тяжами встраиваются один, два или три других β -тяжа, делая $\beta\alpha\beta$ -единицу единожды, дважды или трижды расщеплённой. Понимание причин образования каждого типа $\beta\alpha\beta$ -единицы важно для предсказания пространственной структуры α/β -белков. Мы исходили из того, что встраивание дополнительных β -тяжей между β -тяжами $\beta\alpha\beta$ -единицы должно приводить к изменению характера упаковки входящей в её состав α -спирали и требовать другого распределения гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности этой α -спирали. Проведён анализ первых и последних двух витков α -спиралей, прилегающих к перетяжкам с наиболее распространёнными конформациями в нерасщеплённых, единожды, дважды и трижды расщеплённых $\beta\alpha\beta$ -единицах. В результате показано следующее:

1. Обнаружена зависимость между распределением гидрофильных и гидрофобных остатков в α -спиралях и конформацией перетяжек на их входах и выходах, а также степенью расщеплённости содержащих их $\beta\alpha\beta$ -единиц.

2. Степень расщеплённости $\beta\alpha\beta$ -единицы преимущественно зависит от аминокислотной последовательности первых двух витков α -спирали, в то время как последовательность двух последних витков оказывает влияние на конформацию перетяжки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00150-а.

НОВЫЙ ПОДХОД К МОДЕЛИРОВАНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ

New approach for simulation of electron transport protein-protein interaction

Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1,
стр. 12

Тел.: +7(495)939-02-89; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: ikovalenko78@gmail.com

В последнее время благодаря методам рентгено-структурного анализа и ядерного магнитного резонанса изучены пространственные структуры множества разных белков, однако знание пространственной структуры само по себе недостаточно для понимания механизмов функционирования белков, в том числе белок-белковых взаимодействий. Современные методы компьютерного моделирования и суперкомпьютеры помогают понять, как сложная пространственная структура макромолекул способствует выполнению их биологических функций.

Разработан метод компьютерного моделирования диффузии и взаимодействия белков, позволяющий описать неоднородную пространственную организацию субклеточной системы с учетом детального представления структуры и взаимодействий составляющих ее индивидуальных белковых молекул. В предлагаемом подходе используется комбинация методов броуновской и молекулярной динамики, что позволяет моделировать как диффузию и электростатические взаимодействия белков при образовании ими предварительных диффузионно-столкновительных комплексов, так и трансформацию их в финальный комплекс. В методе броуновской динамики, используемым для моделирования образования предварительных комплексов, взаимодействующие молекулы представляются как твердые тела с определенным распределением зарядов на них, совершающие поступательное и вращательное движения в вязкой среде. Метод полноатомной молекулярной динамики с явным учетом молекул растворителя используется, когда белки уже сблизилась при формировании ими финального комплекса.

Метод позволяет исследовать влияние заряженных аминокислотных остатков, заряда на мембранах, а также параметров среды (ионной силы и pH раствора) на скорость взаимодействия белков. Также метод позволяет исследовать роль геометрических факторов, таких, как размер и форма исследуемой системы и структурная организация компонентов в системе. Проведенные с использованием компьютерной модели расчеты позволили выявить роль этих факторов в изменении характера белок-белковых взаимодействий, осуществляющих регуляцию интенсивности и направленности электронного транспорта в хлоропласте.

Вычислительные эксперименты проводились с использованием суперкомпьютера Ломоносов в Суперкомпьютерном центре Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты 15-07-08927, 14-04-00302 и 15-04-08681.

1. Kovalenko, B., et al., Protein-protein interaction in photosynthetic electron transfer chain: computer simulation, Computational materials and biological sciences, NY: Nova Publishers, 2015, pp. 151-163.

НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН ЛИГАНДОВ И ФЕРМЕНТОВ: ОТ ИДЕЙ К УСПЕХУ**Directed computer-aided design of ligands and enzymes: from ideas to success**

Кондратьев М.С.1, Холявка М.Г.2, Самченко А.А.1, Кабанов А.В.1, Черенков Д.А.3, Хечинашвили Н.Н.1, Артюхов В.Г.2, Комаров В.М.1

1 – Институт биофизики клетки РАН. 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д.3

2 – ФГБОУ ВПО Воронежский государственный университет. 394036, г. Воронеж, Университетская пл., 1

3 – АНОО ВПО Воронежский институт высоких технологий. 394043, г. Воронеж, ул. Ленина, 73А, Воронеж, Воронежская обл.

Тел: 8 (4967) 739-404. Факс: 8 (4967) 330-509. E-mail: ma-ko@bk.ru Тел. 8 (473) 272-73-63.

Достижения в области молекулярной биологии, органическом синтезе и компьютерном моделировании структуры и свойств биосистем сделали возможным направленный дизайн широкого круга молекул для нужд биотехнологии и фармацевтики: резко повышая экономическую эффективность поисковых и прикладных исследований. Дополнительную привлекательность новым, гибридным подходам придает такое важное свойство ряда биополимеров, как самосборка их структуры и зависимость функциональной активности многих макромолекул от их пространственной организации. Особенно важным структурный аспект является в вопросах белковых модификаций и дизайна *de novo*: практически весь набор свойств и функций ферментов определяется укладкой полипептидной цепи и может управляться внесением в последовательность единичных мутаций.

В рамках проектов, реализуемых в нашей лаборатории, исследуются, моделируются природные и создаются новые структуры биомолекул разных классов. Простые молекулы, такие как отдельные аминокислоты, их кремниевые аналоги, драг-кандидаты и короткие пептиды эффективно изучаются методами квантовой химии, молекулярной динамики и гибкого молекулярного докинга. Лиганды, подбираемые к технологически-важным ферментам, рассматриваются как ингибиторы или активаторы биокатализа, модуляторы активности рецепторов, или как агенты для иммобилизации молекул ферментов на подложке-носителе. Активно используется метод предсказания потенциальной биологической активности моделируемых *in silico* веществ.

Белки-ферменты могут быть улучшены путем точечного мутагенеза – в первую очередь это касается повышения стабильности макромолекул – для увеличения их устойчивости к денатурирующему воздействию высоких температур. Несколько лет назад нами был предложен новый подход к повышению термоустойчивости малых глобулярных белков – путем точечного мутагенеза, направленного на увеличение количества альтернативных водородных связей между боковыми группами заряженных аминокислотных остатков на поверхности глобулы фермента. Позднее эта гипотеза, исходно основанная на результатах экспериментов, была существенно дополнена сравнительным моделированием молекулярной динамики малых белков из термофильных и мезофильных организмов. Такой способ повышения термостабильности ферментов позволяет не только расширять сроки хранения препаратов, но и значительно увеличивать скорость энзиматического катализа, что может иметь очевидный экономический эффект. В последние годы нами был создан и протестирован программный продукт, который в полуавтоматическом режиме осуществляет поиск мест для точечных мутаций в ферментах, важных для прикладных биотехнологических задач.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИМЕРИЗАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОФОРНА А: ДОМИНИРУЮЩАЯ РОЛЬ ЭФФЕКТОВ СРЕДЫ

Computer modelling of the dimerization of transmembrane domains of glycophorin A: the dominant role of solvent effects

Кузнецов А.С.1, Полянский А.А.1,2, Волынский П.В.1, Ефремов Р.Г.1,3

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

2 – University of Vienna, Campus Vienna Biocenter 5, Vienna, AT-1030, Austria; 3 – Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

Трансмембранные (ТМ) спиральные домены являются характерными функциональными единицами в составе мембранных белков. Их взаимодействие определяет работу большого числа рецепторных систем клетки, в частности, рецепторных тирозинкиназ [1, 2]. Таким образом, изучение спиральных доменов в мембране является важным для понимания молекулярных аспектов функционирования этих рецепторов. Классическим примером белка, образующего ТМ-димер, является гликофорин А, для которого была предложена концепция «мотивов димеризации» [3]. Она предполагает наличие последовательности характерных аминокислот, присутствие которых предопределяет интерфейс упаковки мономеров и параметры димера. Основной вклад в процесс ассоциации приписывается непосредственному взаимодействию этих аминокислотных остатков [3, 4]. Тем не менее, было показано, что мембрана также вносит свой вклад в димеризацию ТМ-доменов [5], однако детали этого влияния не так хорошо изучены.

В настоящей работе исследовали изменение свойств липидов вблизи ТМ-доменов гликофорина А и гомополимеров – полиаланина и полилейцина – с помощью методов компьютерного моделирования. Показано, что одиночные ТМ-пептиды вызывают формирование в мембране стабильных неоднородностей в пространственном распределении плотности липидов. В случае гликофорина А распределение этих свойств имеет ряд особенностей: липиды иммобилизованы вблизи интерфейса димеризации. Таким образом, встроенные в мембрану пептиды могут «чувствовать» присутствие друг друга на больших расстояниях, когда прямой контакт аминокислотных остатков невозможен. В процессе димеризации образуются новые сайты связывания липидов, причём для гликофорина А этот процесс оказывается также наиболее выгодным. Предполагается, что характерные свойства оболочки из связанных липидов определяют начальный этап формирования потенциального димера в мембране.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 14-14-00871).

1. Bocharov, E.V., Lesovoy, D.M., et. al., Structure, 2013, vol.21, pp. 2087-2093.
2. Endres, N.F., Das, R., et. al., Cell, 2013, vol.152, pp. 543-556.
3. Engelman, D.M., Adair, B.D., et. al., Soc. Gen. Physiol. Ser., 1993, vol.48, pp. 11-21.
4. MacKenzie, K.R., Engelman, D.M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, vol.95, pp. 3583-3590.
5. Polyansky, A.A., Volynsky, P.E., et. al., J. Am. Chem. Soc., 2012, vol.134, pp. 14390-14400.

КВАЗИСТАЦИОНАРНАЯ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИ НЕСТАБИЛЬНАЯ СТРУКТУРА НАТИВНОГО ГЛОБУЛЯРНОГО АКТИНА

Quasi-stationary thermodynamically unstable structure of native globular actin

Кузнецова И.М.1, Поварова О.И.1, Уверский В.Н.1,2, Туроверов К.К.1,3

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

2 – Университет Южной Флориды, Тампа, США,

3 – Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Тел.: +7(812) 297-19-57; e-mail: imk@incras.ru

Нативный актин, G-актин, образуется *in vivo* в результате сложных посттрансляционных процессов фолдинга, которые требуют затрат энергии АТФ и участия шаперонов Hsp 70, пре-фолдина и шаперонина ССТ. G-актин стабилизируется за счет связывания одной молекулы АТФ и одного иона Ca^{2+} (или Mg^{2+} *in vivo*).

Под воздействием химических денатурантов, тепловой обработки и при отщеплении Ca^{2+} происходит денатурация актина с образованием, так называемого, инактивированного актина (I-актина). Инактивированный актин представляет собой компактный олигомер, состоящий из 14-16 субъединиц [1]. Вязкостные и краудинг агенты замедляют процесс превращения нативного актина в инактивированный, но не останавливают этот процесс. Отсутствие кальция или его недостаточная концентрация в растворе ускоряют спонтанный переход G→I. Таким образом, G-актин имеет кинетически стабильную (благодаря высокому энергетическому барьеру между G- и инактивированным состоянием), но термодинамически нестабильную структуру, которая спонтанно переходит в термодинамически стабильное I-состояние, которое определяется аминокислотной последовательностью белка.

Отмечается, что нативный актин имеет общие черты с внутренне неупорядоченными белками (IDPs): он имеет неупорядоченные функционально-значимые области, он постоянно находится в комплексе с одним из своих многочисленных партнеров и, также как внутренне неупорядоченные хаб-белки, играет ключевую роль во многих клеточных процессах [2]. На основании анализа данных о фолдинге актина *in vivo* и данных о его разворачивании *in vitro* была выдвинута гипотеза, согласно которой белки в нативном состоянии могут иметь термодинамически нестабильную структуру. Кинетически стабильная нативная структура таких белков образуется "принудительно", под воздействием внутриклеточной машинерии фолдинга. Денатурация таких белков всегда необратима, поскольку при физиологических условиях аминокислотная последовательность этих белков определяет инактивированное состояние, которое является термодинамически стабильным.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-24-00131)

1. Turoverov, K.K., Biktashev, A.G., Khaitlina, S.Yu., and Kuznetsova, I.M., 1999, *Biochemistry*, vol. 38, pp. 6261-6269.
2. Povarova, O.I., Uversky, V.N., Kuznetsova, I.M., and Turoverov, K.K., 2014, *Intrinsically Disordered Proteins*, vol. 2, p. e34500.

РАЗЛОЖЕНИЕ УФ-СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА НА СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ПРОСТЕТИЧЕСКИХ ГРУПП И АПОБЕЛКА В ДИАПАЗОНЕ ДЛИН ВОЛН 240-320 НМ

Decomposition of Hemoglobin UV Absorption Spectrum into Absorption Spectra of Prosthetic Group and Apoprotein in the wavelength range 240-320 nm

Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1
Тел.: +7(473)220-85-86; e-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Для хромопротеидов характерно поглощение УФ-излучения как апобелковой компонентой, так и простетическими группами. Однако из-за перекрывающихся областей светопоглощения изучение спектральных свойств данных частей макромолекулы сильно затруднено.

Разделение физико-химическими методами сложного белка на его составляющие приводит к ненадежным результатам исследований из-за нарушения системы внутримолекулярных взаимодействий. В конечном итоге это может приводить к значительному изменению спектральных свойств изолированных частей белка, например, вследствие окислительно-восстановительных реакций, протекание которых в исходной макромолекуле отчасти лимитировано ее структурой.

Возможным способом решения этой проблемы является разложение интегрального спектра поглощения макромолекулы математическими методами, которые лишены рассмотренных недостатков, но имеющих, безусловно, свои ограничения.

Нами предложен и протестирован способ разложения спектра поглощения нативной макромолекулы хромопротеида на примере гемоглобина [1].

В основе этого способа лежит алгоритм с определенными условиями и допущениями. Вклад белковой (А) и небелковой (В) частей в интегральный спектр (С) макромолекулы представляется аддитивной моделью. В качестве исходной модели (А0) выступает модель спектра поглощения апобелка, полученная на основе парциальных спектров аминокислот, входящих в его состав. Повышение степени соответствия А0 к целевому А достигается смещением А0 на $\Delta\lambda$ по заданному критерию, при этом получаем спектр А1. Вычитанием А1 из С находим спектр поглощения простетических групп (В1). Так как В1 содержит артефакты, обусловленные остаточным присутствием «отпечатков» полос поглощения хромофоров апобелка, его аппроксимируем интерполирующим полиномом по определенным критериям, получая целевой спектр В. Вычитанием В из С получаем А. Сравнением вторых производных А и В проверяем корректность выполненных преобразований.

Установлено, что апобелковая компонента гемоглобина имеет полосу поглощения с λ_{\max} 278,4 нм, что находится в хорошем соответствии с аналогичными полосами в спектрах поглощения простых белков. Небелковая компонента характеризуется λ_{\max} =269,2 нм, что объясняет положение полосы поглощения в интегральном спектре гембелка (274,2 нм). Проинтегрировав спектры поглощения нативной молекулы гемоглобина и его простетических групп в исследуемом диапазоне длин волн, находим относительную долю последних в спектре поглощения данного белка (78,8%).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАМЕНЫ VAL43ARG В БЕЛКЕ HFQ НА ЕГО СТРУКТУРУ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ**Investigation of the effect of substitution Val43Arg on Hfq protein structure and stability**

Леконцева Н.В., Мурина В.Н., Филимонов В.В., Гарбер М.Б., Никонов С.В., Никулин А.Д.

Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4

Тел.: + 8 (495) 514-02-18; e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Белок Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* является РНК-связывающим белком, принимающим участие во многих процессах, связанных с транскрипцией и трансляцией РНК. Он принадлежит к структурному семейству Sm-подобных белков (Sm-like proteins – Lsm) и формирует в растворе и кристаллах гомогексамеры.

Несмотря на то, что белок выделен из мезофильной бактерии, он обладает экстремальной термостабильностью. Методом микрокалориметрии было показано, что Hfq начинает плавиться при температурах выше 120° С при нейтральных рН. Мы предположили, что важную роль в стабильности и олигомеризации белка должны играть водородные связи между мономерами. Нами было проведены последовательные замены ряда аминокислотных остатков, боковые цепи которых участвуют в образовании межмономерных водородных связей [1]. Было показано, что такие замены приводят к уменьшению стабильности гексамеров, но не к образованию индивидуальных мономеров белка.

В данной работе исследуется влияние на стабильность белка Hfq замены валина в 34 положении на положительно заряженный аргинин. Такая замена в области межмономерного гидрофобного ядра может привести к неспособности белка формировать гексамер. Нами получена генетическая конструкция, кодирующая белок Hfq с заменой Val43Arg. Белок выделен с чистотой, пригодной для кристаллизации. В настоящее время ведутся работы по поиску условий кристаллизации белка и исследованию его термостабильности.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы "Молекулярная и клеточная биология" Президиума РАН и гранта РФФИ №14-04-31215.

1. Мурина, В.Н., Мельник, Б.С., Филимонов, В.В., Улайн, М., Вейсс, М.С., Мюллер, У., и Никулин, А.Д., Влияние замен консервативных аминокислотных остатков на структуру и стабильность белка Hfq, 2014, Биохимия, т. 79, сс. 595-604.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ФЕРМЕНТОВ, МОДИФИЦИРУЮЩИХ АНТИГЕНЫ КРОВИ

Computer modeling of the structure of enzymes modifying blood antigens

Лихацкая Г.Н.1, Бакунина И.Ю.1, Ким Н.Ю.1, Балабанова Л.А.1, Голотин В.В.1, Слепченко Л.В.1, Рассказов В.А.1, Трифонов Е.В.2, Тарасов Г.В.2, Нурминский Е.А.2

1 – ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159

2 – ФГБУН Институт автоматизации и процессов управления ДВО РАН, 690041, г. Владивосток, ул. Радио, 5

Тел.: +7(423)231-99-32; факс: +7(423)231-40-50; e-mail: galinlik@piboc.dvo.ru

Океан – источник уникальных ферментов из морских организмов. Поиск ферментов, модифицирующих антигены крови группы А и В, из морских микроорганизмов показал, что такие ферменты синтезируются бактериями видов *Pseudoalteromonas* sp. и *Arenibacter latericius* и представляют интерес для медицины и биотехнологии. В настоящее время изучены биохимические свойства ферментов, установлены аминокислотные последовательности и получены рекомбинантные нативные и мутантные ферменты. Кристаллические структуры этих ферментов не установлены. Методами структурной биоинформатики с помощью программы MOE 2014.09 были получены теоретические модели пространственных структур ферментов в мономерной и димерной формах. Построены модели комплексов с субстратами, продуктами и ингибиторами. В качестве прототипов для α -галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 (GenBank ABF72189.2) использовалась кристаллическая структура α -галактозидазы *Lactobacillus acidophilus* (PDB 2XN0) и для α -N-ацетилгалактозаминидазы *Arenibacter latericius* KMM 426 (GenBank HQ108058.1) кристаллическая структура α -N-ацетилгалактозаминидазы *Elizabethkingia meningoseptica* (PDB 2IXB). Анализ моделей показал особенности строения ферментов из психрофильных бактерий, выявил атомные детали активных центров ферментов и функционально важные аминокислотные остатки. Содержание элементов вторичной структуры в моделях ферментов по данным программы MOE 2014.09 хорошо согласуется с данными КД-спектроскопии нативных и рекомбинантных ферментов. Проведено сравнительное изучение начальной термоденатурации α -галактозидаз из психрофильных и термофильных бактерий методами молекулярной динамики с помощью программы GROMACS 5.0. Обнаружено, что повышение температуры приводит к конформационным перестройкам доменов психрофильного фермента и увеличению расстояния между каталитическими остатками при более низкой температуре по сравнению с термофильным ферментом. Определены аминокислотные остатки α -галактозидазы, мутация которых может повысить термостабильность фермента из морской бактерии. Проведен поиск α -галактозидаз в геномах морских бактерий. Обнаружено, что α -галактозидазы из морских бактерий *Pseudoalteromonas* имеют идентичность аминокислотных остатков выше 90% и образуют отдельный кластер психрофильных α -галактозидаз на филогенетическом дереве бактериальных α -галактозидаз с охарактеризованными свойствами. Сделано предположение, что ферменты α -галактозидаз из других морских бактерий *Pseudoalteromonas* могут модифицировать антигены крови группы В.

Результаты получены с использованием оборудования ЦКП «Дальневосточный вычислительный ресурс» ИАПУ ДВО РАН. Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00806.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН GROEL/ES. РОЛЬ ЛИГАНДОВ И СОСТАВА РАСТВОРИТЕЛЯ В ПРОЦЕССАХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И САМООРГАНИЗАЦИИ INVITRO**Molecular chaperone GroEL/ES. Role of the ligands and solvent composition in the processes of functioning and self-organization in vitro****Марченков В.В., Рябова Н.А., Марченко Н.Ю., Семисотнов Г.В.**

Институт белка РАН, 142290 г. Пущино Московской области, ул. Институтская, дом 4

E-mail: march@phys.proyres.ru

Молекулярный шаперон клеток *Escherichia coli* GroEL/ES представляет собой крупный олигомерный комплекс, состоящий из 14-ти идентичных субъединиц GroEL (Hsp60) и 7-ми идентичных субъединиц GroES (Hsp10), объединенных в кольцевые структуры и взаимодействующих в присутствии лигандов: ионов Mg^{2+} и адениловых нуклеотидов (АДФ или АТФ). Этот молекулярный шаперон (как и его эукариотический аналог) является важным белковым компонентом клеток, который обеспечивает сворачивание большого разнообразия белков (как вновь синтезированных, так и денатурированных в результате различных клеточных стрессов), их трансмембранный транспорт и деградацию.

В настоящей работе представлены результаты исследований роли лигандов шаперона в процессах его функционирования и сборки *in vitro*. В части исследования взаимодействия GroEL с денатурированными белками, показано, что лиганды GroEL (АДФ, АТФ и GroES) в различной степени ослабляют взаимодействие шаперона с денатурированными белками, а GroES конкурирует с денатурированным белком за сайты связывания с GroEL. В части исследования сворачивания (ренатурации) GroEL и GroES *in vitro* представлены равновесные и кинетические процессы денатурации (разворачивания) и ренатурации (сворачивания). Определены времена сворачивания и охарактеризованы промежуточные конформационные состояния. Показано, что, в отличие от GroES, сборка GroEL *in vitro* происходит только в присутствии лигандов, действие которых может быть имитировано добавлением глицерина или высокими ионными силами раствора.

По результатам исследований предложены модели функционирования GroEL как молекулярного шаперона и его сворачивания *in vitro*.

Авторы благодарны Российскому научному фонду (грант №: 14-24-00157) за финансовую поддержку.

ПРОЦЕССЫ ДЕНАТУРАЦИИ И РЕНАТУРАЦИИ ГЕКСАМЕРНОГО ТЕРМОФИЛЬНОГО БЕЛКА HFQ ИЗ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

The processes of denaturation and renaturation of hexameric thermophilic protein HFQ from *Pseudomonas aeruginosa*

Марченков В.В., Мурина В.Н., Марченко Н.Ю., Леконцева Н.В., Семисотнов Г.В., Филимонов В.В.

Институт белка РАН, 142290 г. Пущино Московской области, ул. Институтская, дом 4
E-mail: march@phys.protres.ru

Большое количество клеточных белков выполняет свою биологическую функцию в олигомерной форме, однако факторы, определяющие сборку и стабильность таких белков, все еще недостаточно изучены. Объектом настоящего исследования является гексамерный белок HFQ (м.в. 70 кДа), относящийся к семейству Sm-подобных белков, одной из функций которого является взаимодействие с малыми РНК. Этот экстремально термофильный белок при нейтральном рН и концентрации порядка 1 мг/мл сохраняет свою структуру вплоть до 115°C и поэтому исследование его термодинамических свойств методами температурного воздействия крайне затруднено.

В данной работе, наряду с тепловой денатурацией, были исследованы равновесные денатурационные переходы HFQ, индуцированные гуанидингидрохлоридом, с использованием флуоресцентной спектроскопии и кругового дихроизма. В качестве метки, чувствительной как к диссоциации олигомерной структуры, так и к конформации собственно мономеров, использовали остатки триптофана, введенные вместо остатков тирозина, находящихся в 55-ом положении в зоне межсубъединичных контактов. Эта замена привела к небольшому снижению стабильности белка, но, согласно оптическим данным, не внесла существенных изменений в его структуру. Преимущество этой замены заключается в том, что высокая чувствительность триптофановой флуоресценции, позволяет работать в широком диапазоне концентраций белка (0,1-100 μ M), недоступном не только для сканирующей микрокалориметрии, но и для кругового дихроизма.

Несмотря на высокую термостабильность, гексамер HFQ не обладает высокой устойчивостью к действию гуанидингидрохлорида. Показано, что кооперативность разрушения структуры HFQ Y55W зависит от концентрации белка, а сам денатурационный переход в общем случае описывается моделью трех состояний, которые соответствуют нативному гексамеру, промежуточному структурированному мономеру и развернутой цепи. При концентрации белка около 1 мг/мл (0,11 мМ мономера) заселенность промежуточного состояния не превышает 15% и денатурационный переход хорошо описывается моделью «двух состояний». Понижение концентрации белка на два порядка приводит к тому, что заселенность промежуточного состояния в максимуме (при концентрации GuHCl около 2M) достигает 80%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-24-00157).

СООТВЕТСТВИЕ СТРУКТУРНЫХ МОТИВОВ БЕЛКОВ ЯДРАМ САМООРГАНИЗАЦИИ**A correspondence of structural motifs in proteins to folding nuclei****Марченко Н.Ю., Гарбузинский С.А.***Институт белка РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 4**Тел.: +7 (495) 514-02-18; факс: +7 (495) 514-02-18; e-mail: sergey@phys.protres.ru*

Формирование ядра самоорганизации (ядра сворачивания) – ключевой этап процесса самоорганизации белковой молекулы, лимитирующий скорость всего процесса самоорганизации. Экспериментально исследованные на данный момент ядра сворачивания очень разнообразны по своей структуре, размеру, типу стабилизирующих взаимодействий, содержанию и типу вторичной структуры, вовлечённости в гидрофобное ядро глобулы и т.п. Однако нам удалось определить структурный элемент, соответствующий ядрам сворачивания большинства исследованных белков. В данной работе на большой базе данных (включающей более 700 аминокислотных остатков с экспериментально исследованной степенью вовлечённости в ядро сворачивания, из 50 глобулярных белков) показано соответствие экспериментально исследованных ядер сворачивания корневым структурным мотивам: конструкциям из нескольких элементов вторичной структуры, обладающим характерной укладкой этих элементов, хиральностью и широко распространённым в различных белках. Вовлечённость в ядра сворачивания аминокислотных остатков, входящих в корневой структурный мотив любого типа, достоверно выше, нежели у остальных аминокислотных остатков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01554-А) и программы "Молекулярная и клеточная биология" Российской академии наук (№ 01201358029).

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ КАК МЕТОД ОЧИСТКИ И ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИЗАТАХ

Affinity chromatography on the base of denatured proteins as the method of purification and express-analysis of molecular chaperones content in cell lysates

Марченко Н.Ю., Марченков В.В., Кашпаров И.А., Семисотнов Г.В.

Институт белка РАН, 142290 г. Пущино Московской области, ул. Институтская, дом 4

E-mail: march@phys.protres.ru

Молекулярные шапероны, которые являются, в основном, белками теплового шока (HSPs), участвуют во многих клеточных процессах, и поэтому большое количество заболеваний различных организмов так или иначе связаны с функционированием молекулярных шаперонов. В работе представлены данные по разработке метода аффинной хроматографии на основе денатурированных белков для очистки и анализа содержания шаперонов в клеточных лизатах. В отличие от иммуноферментного анализа, метод аффинной хроматографии основан на главной функциональной особенности шаперонов – связывать полипептиды, лишенные жесткой третичной структуры. Таким образом, этим методом выявляются только функционально активные шапероны.

Созданы аффинные носители на основе как положительно, так и отрицательно заряженных денатурированных белков, и их сорбционные свойства были исследованы с использованием чистого шаперона клеток *E. coli* GroEL (Hsp60). Показано, что взаимодействие GroEL с отрицательно заряженными белками требует либо наличия ионов Mg^{2+} , либо повышенной ионной силы раствора (более 300 мМ). Взаимодействие GroEL с положительно заряженными белками происходит как в отсутствие ионов Mg^{2+} , так и при низкой или физиологической ионной силе раствора. Определены емкости аффинных носителей на основе денатурированных пепсина и лизоцима. Анализ различных клеточных лизатов показал, что наибольшим сродством к различным шаперонам обладает аффинный носитель на основе денатурированного лизоцима, который, кроме основного шаперона Hsp60, связывает и другие шапероны (такие как Hsp100, Hsp40 и малые белки теплового шока).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-24-00157).

**МУТАЦИОННЫЙ ПОДХОД, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ОПРЕДЕЛИТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
РАЗРУШЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛКА ПРИ ЕГО РАЗВОРАЧИВАНИИ.
ИССЛЕДОВАНИЕ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ И ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА**

Mutational approach allowing determination of the disruption sequence of structural elements in the protein. Studies of the carbonic anhydrase B and the green fluorescent protein

Мельник Б.С., Нагибина Г.С., Поварницына Т.Н., Глухов А.С., Мельник Т.Н.

Институт белка РАН, 142290, г. Пушкино, Институтская, д. 4

E-mail: bmelnik@phys.protres.ru

В работе использован экспериментальный подход, названный Φ -анализ, позволяющий понять последовательность разрушения структурных элементов белка при его денатурации [1]. Этот подход применим для исследования белков, сворачивании/разворачивание которых проходит в несколько стадий, через образование/разрушение нескольких промежуточных состояний. Суть подхода состоит в систематическом исследовании мутантных форм белка с одиночными заменами аминокислотных остатков и с введенными цистеиновыми мостиками. При этом заменяемые аминокислотные остатки должны быть в одних и тех же структурных элементах белка. Одиночные замены гидрофобных аминокислот позволяют получить информацию в основном о структурных элементах белка, которые разворачиваются первыми. Введение цистеиновых мостиков на поверхности белка позволяет исследовать структурные элементы белка, которые разворачиваются последними. Проведя калориметрические исследования неравновесного плавления карбоксиангидразы Б (BCAB) и зеленого флуоресцентного белка (GFP), мы получили информацию о константах скоростей разворачивания восьми мутантных форм GFP и десяти мутантных форм BCAB. Анализ влияния мутаций на скорости разных этапов разворачивания этих белков позволяет определить последовательность разрушения структурных элементов зеленого флуоресцентного белка и карбоксиангидразы при их тепловой денатурации.

Работа поддержана грантами РФФИ (13-04-00923 и 14-04-00925). Калориметрические исследования карбоксиангидразы Б проведены при поддержке РФФ (грант №14-24-00157).

1. Melnik, T.N., Povarnitsyna, T.V., et al., PLoS One, 2012, vol. 7, no. 11, p. e48604.

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДОМЕНА I РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 АРХЕИ HALOARCUA MARISMORTUI СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ РРНК

KINETIC ANALYSIS OF INTERACTIONS OF domain I of RIBOSOMAL PROTEIN L1 Haloarcula marismortui WITH SPECIFIC rRNA FRAGMENTS

Михайлина А.О., Костарева О.С., Тищенко С.В., Гарбер М.Б., Никонов С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН, 142290, Пушкино, ул. Институтская, 4

Тел./факс: +7-495-514-02-18, e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com

Пространственная структура рибосомной 50S субчастицы археи-галофила *Haloarcula marismortui* определена более десяти лет назад с разрешением 2,4 Å и затем несколько раз уточнялась. Однако, как в первоначальной, так и в последующих моделях отсутствовали некоторые функционально важные подвижные участки, в частности, область L1 выступа. L1 выступ образован рибосомным белком L1 и спиралями 76, 77 и 78 23S рРНК, он является частью E-участка рибосомы и способствует удалению деацелированной тРНК. Целью нашей работы является исследование РНК-белковых взаимодействий в L1 выступе большой рибосомной субчастицы галофильной археи.

Известно, что домен I бактериального белка L1 необходим и достаточен для связывания целого белка L1 с РНК. Мы получили генетические конструкции, выделили и очистили белок L1 *H. marismortui* (HmaL1), его домен I (HmaL1dI) и специфический фрагмент 23S рРНК *H. marismortui*, взаимодействующий с белком L1. Белки в условиях с низкой ионной силой демонстрировали высокую агрегационную способность и имели неупорядоченную структуру. При повышении концентрации соли до 3М NaCl (KCl) HmaL1 приобретал элементы вторичной структуры, а HmaL1dI был структурно упорядочен. Тем не менее, нам не удалось зафиксировать взаимодействие HmaL1 и HmaL1dI со специфическим фрагментом 23S рРНК традиционными методами гель-фильтрации и «гель-шифта».

Методом поверхностного плазмонного резонанса, который позволяет наблюдать взаимодействие молекул в реальном времени, мы показали, что HmaL1dI в условиях с низкой концентрацией соли (50мМ) способен взаимодействовать как со специфическим фрагментом бактериальной 23S рРНК *Thermus thermophilus* ($K_d=137$ нМ), так и со специфическим фрагментом 23S рРНК *H. marismortui* ($K_d=5,8$ мкМ). Комплексы формируются медленно и обладают невысокой стабильностью. В таких же условиях с низкой ионной силой целый белок HmaL1 образует лишь агрегаты, не взаимодействующие с рРНК.

Таким образом, вероятно, олигомеризация белка HmaL1 происходит, в основном, благодаря его домену II. Поскольку при 50 мМ соли HmaL1dI неструктурирован, мы предполагаем, что р-белок из галофильной археи может взаимодействовать с РНК лишь в условиях, когда он имеет неупорядоченную структуру, например, в процессе котрансляционного сворачивания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00414_а) и Программы МКБ Президиума РАН.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА IRES-ЭЛЕМЕНТА ПЕРВОГО ТИПА, СПОСОБНОГО СВЯЗЫВАТЬСЯ С ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ГЛИЦИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗОЙ.**Determination of the minimum IRES-I fragment that is capable to bind human glycyl-tRNA synthetase**

Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Никонов О.С., Гарбер М.Б.

Институт белка РАН, 142290, Московская область, г.Пушино, ул. Институтская д.4
8(4967)318285, 8(4967)318435, katya_nik@vega.protres.ru

Участки внутренней посадки рибосомы (IRES-элементы) – это специфические структурные элементы РНК, располагающиеся в 5'-нетранслируемой области мРНК. На этих участках мРНК происходит кэп-независимая инициация ее трансляции. Изначально они были описаны у пикорнавирусов, а позже найдены и в мРНК вирусов из других семейств. IRES-элементы пикорнавирусов в зависимости от их вторичной структуры сейчас подразделяют на 4 типа. Тип I имеет такую же структуру как IRES энтеровирусов и риновирусов, тип II – как в IRES вируса энцефаломиокардита, тип III – как IRES вируса гепатита А и тип IV – как IRES тешовируса. IRES-элементы пикорнавирусов типов II и IV изучены значительно лучше, чем типов I и III.

Несмотря на активное изучение IRES-элементов типа I, механизм их функционирования до сих пор не вполне ясен. Более того, до сих пор нельзя быть уверенными, что определены все участники кэп-независимой инициации трансляции на этом типе IRES-элементов. Недавно в лаборатории И. Н. Шатского (ИФХБ МГУ) был проведен скрининг факторов, участвующих в процессе посадки рибосомной субчастицы на IRES-элемент. В результате был обнаружен новый компонент, необходимый для трансляции полиовирусной РНК, - глицил-ТРНК синтетаза (GlyRS). Было показано, что этот «хозяйский» фермент специфически связывается с пятым доменом IRES-элемента полиовирусной мРНК. Апикальная часть домена V имитирует антикодонную шпильку глициловой ТРНК и содержит глициновый «антикодон» ACC. Аналогичные структуры присутствуют во всех IRES-элементах типа I.

В данной работе мы попытались определить минимальный фрагмент IRES-элемента энтеровируса, который связывается с человеческой глицил-ТРНК синтетазой, образуя прочный комплекс, пригодный для кристаллизации. На основании анализа известной структурной информации методом гомологичного моделирования мы построили теоретическую модель комплекса фрагмента IRES и ABD домена человеческой глицил-ТРНК синтетазой (GlyRS). Молекулярно динамические исследования и анализ структуры полученной модели позволили обоснованно предположить, что минимальный фрагмент IRES элемента способный сформировать устойчивый комплекс с GlyRS должен содержать «антикодонную» шпильку длиной не менее 29 нуклеотидов. Нами были получены конструкции ДНК, несущие гены нескольких фрагментов вирусного IRES-элемента первого типа (содержащие «антикодонную» шпильку и длиной от 29 до 62 нуклеотидов). Соответствующие фрагменты мРНК наработаны в препаративных количествах. Методом гель-электрофореза нуклеиновых кислот в ПААГ в неденатурирующих условиях нами было показано, что цитоплазматическая форма глицил-ТРНК синтетазы полностью связывает все полученные фрагменты IRES-элемента в эквимольном соотношении. Т.о. для экспериментов по кристаллизации комплекса человеческой глицил-ТРНК синтетазы с IRES-элементом можно использовать полученный минимальный фрагмент длиной 29 нуклеотидов.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ №15-14-00028.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ ИЕРСИНИЙ

Using of tryptophan fluorescence for type identification of non-specific Yersinia porins

Новикова О.Д., Лихацкая Г.Н., Чистюлин Д.К., Ким Н.Ю., Исаева М.П., Сидорова О.В., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

Тел.: +7(423)231-140-30; факс: +7(423)231-40-50; e-mail: novolga_05@mail.ru

Мониторинг изменений параметров спектра суммарной и/или триптофановой эмиссии белка в денатурирующих условиях часто используется при систематическом изучении белков, имеющих подобную пространственную организацию молекулы в целом, и одновременно, характерные структурные особенности, как правило, определяющие его спектральные характеристики. Учитывая высокую чувствительность метода флуоресценции, достоверную информацию об особенностях структуры исследуемого белка (в общем ряду ему подобных), можно получить, используя его минимальное количество. Такой подход был использован нами для идентификации типа неспецифических поринов наружной мембраны иерсиний.

На основании данных о первичной структуре OmpF и OmpC поринов *Yersinia enterocolitica* и *Y. ruckeri* с помощью метода гомологичного моделирования были построены их теоретические модели. В качестве прототипа был использован белок ompk36 из *K. pneumoniae* (код PDB 1OSM), для которого известны данные рентгеноструктурного анализа. При суперпозиции полученных моделей обнаружено, что мономеры OmpF и OmpC поринов различаются длиной и конформацией некоторых наружных петель, а также локализацией одного из 3-х остатков триптофана. Два остатка триптофана (Trp56 и Trp105) в OmpF и (Trp56 и Trp104) в OmpC белках расположены одинаково, в β 2-тяже и L3-петле, локализация и микроокружение третьего остатка Trp222 в OmpF и Trp184 в OmpC существенно различаются. В случае OmpF поринов остаток Trp222 находится на внешней поверхности β -барреля (в β 10-тяже) и лишь частично доступен растворителю. В случае OmpC поринов остаток Trp184 расположен в середине T5-изгиба и полностью доступен растворителю. Согласно ранее полученным результатам, в спектрах триптофановой флуоресценции термоденатурированного OmpF порина *Y. enterocolitica* и *Y. ruckeri* наблюдался значительный сдвиг максимума излучения в красноволновую область, а в случае OmpC порина такого сдвига не регистрировалось. Для выяснения природы этих различий (влияния ближайшего окружения и контактов остатков триптофана в белках) был проведен анализ 3D-структур нативных и термоденатурированных мономеров OmpC и OmpF поринов указанных видов иерсиний с помощью метода молекулярной динамики. Анализ различий в конформации (пространственной ориентации) остатков триптофана в OmpC и OmpF поринов исследуемых иерсиний, наблюдаемой в результате термоденатурации этих белков был проведен с помощью молекулярной симуляции 3D-структур мономеров при температурах 300 и 370 K (27 и 97 °C соответственно). Обнаружено, что остаток Trp212 в OmpF порине при увеличении температуры становится в два раза более доступным для растворителя, в то время как Trp184 в OmpC белке практически не меняет своей доступности.

Описанный подход может быть с успехом применен для экстенсивных исследований поринов иерсиний, поскольку указанные выше различия в локализации одного из 3-х остатков триптофана характерны для всех известных неспецифических поринов (OmpF и OmpC типа) наружной мембраны бактерий этого рода.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ АКТИВАЦИИ КАНАЛА TRPV1 МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**Temperature-induced activation of TRPV1 channel: a molecular dynamics study*****Нольде Д.Е.1,2, Волынский П.Е.1, Чугунов А.О.1, Крылов Н.А 1,2, Ефремов Р.Г.1,2***

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Межведомственный суперкомпьютерный центр РАН, 119991 Москва, Ленинский проспект, 32а

Тел.: +7(495)336-20-00; факс: +7(495)336-20-00; e-mail: nolde@nmr.ru

TRPV1 – рецептор, отвечающий за чувствительность к повышенной температуре. Он является неселективным катионным каналом, который может быть активирован с помощью широкого спектра внешних и внутренних физических и химических раздражителей, таких как: капсаицин, кислые рН, повышение температуры выше 42°C и др. На данный момент известна экспериментальная структура канала TRPV1 крысы в открытом и закрытом состояниях, определенная методом электронной крио-микроскопии. Канал образован 4 идентичными субъединицами, расположенными вокруг центральной поры. В поре присутствуют два узких участка, называемые верхними и нижними воротами. Верхние ворота образованы атомами основной цепи остатков Gly-643 и боковых цепей Met-644. Нижние ворота образованы остатками Ile-679.

Для исследования влияния температуры на изменение структуры TRPV1 проведен ряд длительных расчетов (1 мкс) молекулярной динамики (МД) рецептора в гидратированном липидном бислое. Показано, что структура канала в открытой и закрытой формах стабильна при температуре 310 К. Следует отметить, что конформации отдельных субъединиц в ходе МД не являются идентичными, как в экспериментальной структуре, и структура поры (особенно в закрытом состоянии) несимметрична. Повышение температуры до 325 или 340 К приводит к значительным конформационным перестройкам в районе верхних и нижних ворот. Так спираль 630-642 одной из субъединиц сдвигается примерно на 2 Å вдоль оси в сторону N-конца, при этом изменяется конформация боковых цепей Met-644, что приводит к открыванию верхних ворот. Также сдвигается спираль 674-686 этой же субъединицы, что приводит к частичному открыванию нижних ворот.

Наблюдаемая нами в расчетах МД температурная активация канала может быть связана с другими механизмами активации рецептора TRPV1. Таким образом, метод МД в полном атомном силовом поле применим для изучения таких больших систем, как ионные каналы.

Работа поддержана грантом РФФ 14-24-00118 и выполнена на вычислительных ресурсах Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН.

СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ДИНАМИКИ МИКРОТРУБОЧЕК.

Systematic analysis of molecular models of microtubule dynamics.

Орлова М.В.1, Ульянов Е.В.1, Захаров П.Н.2, Атауллаханов Ф.И.1,2,3, Гудимчук Н.Б.1,2,3

1 – Физический факультет МГУ имени Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, д.1, г. Москва

3 – ЦТП ФХФ РАН, 119334 Москва, Ленинский пр., 38;

E-mail: gudimchuk@yahoo.com

Микротрубочки являются компонентом цитоскелета и представляют собой полые цилиндрические структуры, состоящие из 13 протофиламентов из белка тубулина. Микротрубочки динамически нестабильны: они попеременно переходят от сборки к укорочению, что играет ключевую роль в разведении сестринских хромосом по дочерним клеткам в процессе клеточного деления. Механизм динамической нестабильности микротрубочек остается до конца не выясненным, несмотря на его интенсивные исследования в течение последних 30 лет. На наиболее полное количественное описание динамики микротрубочек претендуют молекулярно-кинетические модели с детализацией на уровне отдельных димеров тубулина. На сегодняшний день в литературе отсутствует полный анализ этих моделей и сравнительная оценка их соответствия новейшим экспериментальным данным. Чтобы понять, могут ли эти модели описать все основные структурные, биохимические, механические и кинетические экспериментальные данные о микротрубочках, мы систематически проанализировали четыре опубликованных модели и нашу новую молекулярно-механическую модель применительно к спектру опубликованных экспериментов.

Согласно нашему анализу, исторически более ранние и более простые молекулярно-кинетические модели Чена-Хилла [1], и Бейли с соавторами [2] не могут верно описать разницу форм концов растущих и укорачивающихся микротрубочек. Более поздние модели ВанБюрена с соавторами [3] и Марголина с соавторами [4] справляются с этой задачей лучше, но только лишь на качественном уровне. Интересно, что более простые модели [1,2] лучше описывают слабую зависимость скорости укорочения микротрубочек от концентрации тубулина. При этом ни одна из молекулярно-кинетических моделей не способна правильно описать слабую зависимость частоты катастроф от концентрации тубулина, а также воспроизвести неэкспоненциальное распределение времен жизни микротрубочек- эффект, известный как «старение» микротрубочек.

Недавно разработанная нами молекулярно-механическая модель, напротив, показывала хорошее качественное соответствие всем экспериментальным данным, включая зависимости параметров динамической нестабильности от концентрации тубулина и эффект «старения» микротрубочек. Однако расчеты в этой модели требуют значительных временных и вычислительных затрат, в связи с чем моделирование на данный момент ограничено сравнительно короткими временами жизни микротрубочек. Этот факт говорит о необходимости построения новых быстродействующих молекулярно-кинетических моделей микротрубочек с учетом прогрессивных черт механической модели или разработки методов ускорения молекулярно-механических расчетов. В целом наш анализ выявил сильные и слабые стороны существующих моделей и продемонстрировал важные направления для дальнейшего теоретического моделирования динамики микротрубочек.

1. Chen, Y.D. and Hill, T.L., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 1985, vol. 82, no. 4, pp. 1131-1135.

2. Bayley, P.M., Schilstra, M.J., and Martin, S. R., J. Cell Sci., 1990, vol. 95, no. 1, pp. 33-48.

3. VanBuren, V., Odde, D.J., and Cassimeris, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, vol. 99(9), pp. 6035-6040.

4. Margolin, G., Gregoret, I.V., Cickovski, T.M., Li, C., Shi, W., Alber, M.S., and Goodson H.V., Mol. Biol. Cell, 2012, vol. 23, no. 4, pp. 642-656.

РОЛЬ ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ НА ОСНОВЕ ИНСУЛИНА**The importance of hydrophobic interactions during insulin fibrillogenesis**

Поварова О.И., Сулацкая А.И., Кузнецова И.М., Туроверов К.К.

ИНЦ РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр, 4

Тел.: +7(812)297-19-57; факс: +7(812)297-35-41; e-mail: olp@incras.ru

Как известно, образование амилоидных фибрилл сопутствует ряду тяжелых заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и т.д. Долгое время считалось, что внутри- и внеклеточные отложения амилоидных фибрилл являются причиной заболеваний. Однако исследования последних лет показали, что это, по крайней мере, не всегда так, и что наиболее токсичными для клетки являются не зрелые фибриллы, а их предшественники: протофибриллы или токсичные белковые олигомеры. Изучение этих структур осложнено тем, что, в отличие от амилоидных фибрилл, они нестабильны и могут иметь различную структуру.

В настоящей работе процесс образования амилоидных олигомеров, предшественников амилоидных фибрилл, изучали с использованием гидрофобного зонда АНС и флуоресцентного красителя тиофлавина Т (ThT), относящегося к классу так называемых молекулярных роторов. ThT избирательно взаимодействует с белками в состоянии амилоидных фибрилл, образуя при этом интенсивно флуоресцирующий комплекс, в то время как АНС взаимодействует с гидрофобными кластерами, локализованными на поверхности белковой глобулы или встраивается в гидрофобные карманы белков. Кинетику образования амилоидных фибрилл на основе инсулина наблюдали при различных условиях фибриллогенеза.

В процессе фибриллогенеза происходит bathochromный сдвиг спектров поглощения и возбуждения флуоресценции как АНС, так и ThT, что свидетельствует об изменении микроокружения молекул красителей за счет их взаимодействия с образующимися белковыми структурами. Показано, что скорость образования амилоидных фибрилл и олигомеров зависит от условий фибриллогенеза – температуры и pH раствора, присутствия денатурирующих химических веществ и интенсивности перемешивания исследуемого образца. Присутствие в растворе АНС влияет на скорость протекания фибриллогенеза инсулина, существенно замедляя этот процесс. По-видимому, АНС взаимодействует с гидрофобными кластерами на поверхности белковой глобулы в денатурированном состоянии и при этом ингибирует олигомеризацию молекул белка. Это подтверждает существенную роль гидрофобных взаимодействий в этом процессе.

Работа поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (проекты №№ 14-04-90024 и 13-04-02068).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОПАНТЕТЕИН АДЕНИЛИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.

Computer-aided studies of Phosphopantetheine adenylyltransferase from mycobacterium tuberculosis

Подшивалов Д.Д.1,2,3, Тимофеев В.И.2,3, Куранова И.П.2,3

1 — МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Лен. горы, 1, стр. 2

2 — Институт кристаллографии РАН имени А.В. Шубникова, 119333, Москва, Ленинский пр., 59

3 — НБИКС-центр, НИЦ “Курчатовский институт”, 123182, Москва, площадь Академика Курчатова, 1

Тел.: +7(915)217-60-00; e-mail: david.podshivalov@mail.ru

Фосфопантетеин аденилилтрансфераза из *Mycobacterium tuberculosis* (PPAT Mt) участвует в пятистадийном процессе синтеза кофермента-А (CoA) в туберкулезной микобактерии и катализирует четвертую, предпоследнюю реакцию — синтез дефосфо-CoA (dPCoA) из 4'-фосфопантетеина и молекулы АТФ. Данная стадия является ключевой, так как именно на ней регулируется количество CoA, ингибитора для данной реакции, работающего по принципу обратной связи. Существует несколько причин для изучения трехмерной структуры PPAT Mt. Во-первых, данные о структуре комплексов PPAT Mt в связи с лигандами позволяют лучше понять механизм ингибирования белка на атомарном уровне. Также известно, что патогенная бактерия *Mycobacterium tuberculosis* быстро адаптируется к антитуберкулезным препаратам. Поэтому конструирование противотуберкулезных лекарств является важной задачей. PPAT Mt может быть использована в качестве мишени для направленного конструирования ингибиторов — новых потенциальных противотуберкулезных препаратов.

Ранее структуры рекомбинантной PPAT Mt в апо-форме и в комплексе с АТФ были определены с разрешением 1.62 и 1.70 Å (PDB ID: 4e1a и 3uc5) Исследуемые кристаллы были получены в условии микрогравитации [1].

На основе этих данных с помощью методов компьютерного моделирования были изучены в динамике полученные структуры. В ходе компьютерного исследования смоделировано структурное изменение в области активного центра PPAT Mt. С помощью смешанного QM/MM метода была получена модель реакции.

Кроме того, полученные данные были использованы для поиска потенциальных ингибиторов PPAT Mt с применением метода виртуального скрининга. В результате были получены четыре модели потенциальных ингибиторов PPAT Mt, на основе которых планируется разработка инновационного противотуберкулезного препарата.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 14-02-31110_мол_а и ЦНИИМаш Роскосмоса.

ИЗУЧЕНИЕМЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИМИ И ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ НА ПРИМЕРЕ БЕЛКОВ БСА, Н1ИHMGB1/2**Investigation of intermolecular complexes using hydrodynamic and optical methods on the example of BSA, H1 and HMGB1/2 proteins****Поляничко А.М.1,2, Михайлов Н.В.1, Созонова А.А.1, Баранова Ю.Г.1, Романов Н.М.1, Чихиржина Е.В.2**

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9;

2 – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Тел: +7(812)428-45-26; факс: +7(812)428-72-00; e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Ядерные белки гистон Н1 и негистоновые белки HMGB1/2 являются одними из самых распространенных белков хроматина. Основной функцией гистона Н1 и негистонового белка HMGB1 является регуляция уровня экспрессии генов. Связавшись с ДНК, оба белка способны влиять на её структуру и функционирование. Отдельной задачей является изучение взаимодействия этих белков между собой и возможное образование тройного надмолекулярного комплекса ДНК – Н1 – HMGB1/2.

Данная работа посвящена изучению механизмов образования межмолекулярных комплексов гидродинамическими и оптическими методами. Для отработки методик проведения экспериментов в данной работе использовались растворы БСА (Бычий Сывороточный Альбумин), являющегося модельным объектом для многих лабораторных исследований. В качестве исследуемой системы в данной работе выступили комплексы на основе гистона Н1 и негистоновых белков HMGB1/2.

Исследование механизмов образования межмолекулярных комплексов проводилось с использованием следующих методов: круговой дихроизм, ИК спектроскопия, аналитическое ультрацентрифугирование, метод измерения ζ -потенциала, динамическое рассеяние света, гель-электрофорез и гель-фильтрация. Анализ полученных результатов показал, что мономеры БСА находятся в растворе в состоянии динамического равновесия с агрегатами БСА. Установлено, что на процесс агрегации молекул БСА влияют такие факторы как состояние вторичной и третичной структуры БСА, заряд молекул БСА, а также стабильность гидрофобных взаимодействий, участвующих в образовании агрегатов. Показано, что формирование межмолекулярных комплексов между гистоном Н1 и негистоновым белком HMGB1 происходит за счет их электростатических взаимодействий, при этом характер связывания гистона Н1 с гомологичными белками HMGB1 и HMGB2 существенно различен.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№№ 15-04-06993, 15-08-06876) и Администрации г. Санкт-Петербурга. Часть работ была выполнена с использованием оборудования РЦ научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники», «Развитие молекулярных и клеточных технологий»

ОЦЕНКА СРОДСТВА БЕЛКА DPS К ЛИНЕЙНЫМ И РАЗВЕТВЛЕННЫМ МОЛЕКУЛАМ ДНК.

Assessment of DPS protein affinity to linear and branched DNA molecules

Преображенская Е.В.1, Антипов С.С.1,2,3, Мелехов В.В.4., Артюхов В.Г.1., Озолин О.Н.2,3

1 – Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

2 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

3 – Пущинский государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино, пр. Науки, 3

4 – Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 7

Тел.: +7(473) 220-8981; Факс: +7(4967)33-05-09; e-mail.: elena.vl.preobrazhenskaya@gmail.com

Dps – мажорный белок бактериального нуклеоида, конденсирующий геном и защищающий его от повреждений в условиях различных стрессов. Это означает, что его взаимодействие с ДНК является фундаментальной биологической функцией. Ключевая роль в связывании принадлежит остаткам лизина и аргинина в позициях 5, 8, 10 и 18 у двенадцати N-концевых модулей [1]. Их положительный заряд позволяет связывать отрицательно заряженную ДНК подобно гистонам в эукариотическом геноме, что не предполагает никаких предпочтений по отношению к нуклеотидной последовательности, хотя и не исключает зависимости от структурных особенностей ДНК. Известно, что делеция гена *dps* изменяет спектр синтезируемых в бактериях белков и влияет на синтез некоторых мРНК. Это является весомым аргументом, указывающим на наличие каких-то особых мишеней для взаимодействия с Dps, несмотря на то, что в его структуре нет классических ДНК-связывающих модулей. Ранее, мы обнаружили, что повышенное сродство к Dps имеют А/Т-богатые фрагменты ДНК [2], поэтому именно такие ДНК были использованы в этой работе.

Так как, большинство регуляторных белков взаимодействуют с регуляторными областями собственных генов, для исследования были использованы 2 фрагмента промоторной области *dps*. Первый (259 п.о.) был взят из проксимальной к гену части генома и имел в своем составе основной промотор P_{dps} . Вторым (214 п.о.), содержал дистальную часть регуляторной области и включал несколько дополнительных промоторов (P_1 , P_2 и P_3), которые важны для обеспечения максимального уровня транскрипции. Эффективность связывания оценивали методом задержки в геле в условиях конкуренции двух фрагментов за белок. Это позволило наглядно продемонстрировать повышенное сродство Dps к проксимальному фрагменту. Уже при трехкратном избытке белка он практически полностью связывался с Dps, в то время, как часть дистального фрагмента оставалась свободной [3]. Но для обоих фрагментов методом атомно-силовой микроскопии были зарегистрированы аналогичные комплексы с Dps, которые формировались на концах двойной спирали. Предположив, что ключевую роль в комплексообразовании играют участки однонитевой ДНК, закономерно возникающие на концах линейных фрагментов, мы приготовили два типа разветвленных молекул ДНК. В одном случае модельная конструкция содержала 32 пары двойной спирали и два однонитевых конца такой же длины, во втором – все три ветви Y-образной структуры были двухнитевыми. Обе модельные конструкции взаимодействовали с Dps. В первом случае это приводило к увеличению длины однонитевых фрагментов, а во втором - Dps контактировал с точкой ветвления без видимого расплетания двойной спирали. Таким образом, Dps имеет некоторую избирательность к однонитевым участкам на концах линейных молекул и может влиять на их структурное состояние. Ещё более высокое сродство Dps имеет к разветвленным фрагментам двухнитевой ДНК, которые могут формироваться в природной ДНК, содержащей прямые и инвертированные повторы нуклеотидной последовательности.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России № 2014/281

1. Ceci, P., et al., *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol.32, pp. 5935-5944.
2. Purto, Y.A., et al., *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2014, vol. 12, p. 1441006.
3. Melekhov, V.V., et al., *PlosOne*, 2015, vol.10, no. 5, p. e0126504.

АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ, ОТНОСЯЩИЙСЯ К АЛЬФА-ХАРПИНИНАМ НОВЫЙ ТИП ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ**A novel spatial type of plant antimicrobial peptides belonging to alpha-hairpinins****Рогожин Е.А.1, Бозин Т.Н.2, Щукина В.Д.1, Бочаров Э.В.1**

1 – Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

2 – РЦ Курчатовского комплекса НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Тел.: +7(495)336-40-22; e-mail: rea21@list.ru

Пространственная структура антимикробного пептида – нигеллина-1.1 (nigellin-1.1), выделенного из семян черного тмина (*Nigella sativa* L.), определена методом ЯМР-спектроскопии с использованием спектрометра Varian NMRS-700 (РЦ Курчатовского комплекса НБИКС-технологий). Для последовательного отнесения ^1H , ^{13}C резонансов и кросс-пиков ЯЭО были накоплены двумерные $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ЯМР спектры DQF-COSY, TOCSY и NOESY, а также гетероядерный спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC (на природном содержании изотопа ^{13}C). Расчет пространственной структуры выполнялся методом молекулярной динамики в пространстве торсионных углов в программе CYANA (ETH Zürich) с использованием алгоритма “моделируемого отжига” (simulated annealing). Конформация полипептида нигеллина-1.1 включает две взаимодействующие друг с другом α -спирали Arg2-Cys14 (с витком 3_{10} -спирали Thr15-Ile17 на С-конце) и Tyr20-Thr36 (с N-“кэп” водородной связью между боковой и основной цепью остатков Asp19-Gly22). Остаток Pro18 из короткой петли, соединяющей α -спирали, находится *trans* конфигурации. Таким образом, пептид нигеллин-1.1 имеет вид левозакрученной шпильки с углом между антипараллельными α -спиралями $\sim 160^\circ$, которая стабилизирована тремя дисульфидными связями Cys6-Cys34, Cys10-Cys30 и Cys14-Cys26. При этом, распределение полярных и гидрофобных остатков в шпильке неравномерно, в результате ее поверхность амфифильна, что указывает на возможную мембранную активность пептида нигеллина-1.1, а общая гомология пространственных структур указывает на принадлежность к семейству α -харпининов, или харпино-подобных пептидов, в виде отдельной так называемой «структурной ветви» с тремя дисульфидными мостами.

ВЗАИМОСВЯЗЬ КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ МОЛЕКУЛ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА И СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИХ РАСТВОРА В ШИРОКОМ ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ФАЗОВОЙ ДИАГРАММЫ

Interrelation of conformational state of globular protein molecules and structural organization of their solutions in a wide temperature range based on an analysis of phase diagram

Рожков С.П., Горюнов А.С.

Институт биологии Карельского НЦ РАН, 185610, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11
Тел.: +7(814)276-52-64; факс: +7(814)276-98-10; e-mail: rozhkov@krc.karelia.ru

Существует значительный интерес к исследованию структурно- конформационных изменений биомакромолекул при повышенных температурах и/или под действием денатурантов в связи с процессами агрегации и фибрилlogenеза, однако часто эти явления рассматриваются как кинетические процессы. Мы исходим из предположения, что эти явления во многом имеют термодинамическую природу и могут быть объяснены с учетом фазовых диаграмм белковых растворов. В связи с этим предложена обобщенная фазовая диаграмма (ФД) белкового раствора в широком диапазоне температур, которая рассматривает последовательные конформационные превращения молекул белка под действием температуры в сопряжении с фазовыми переходами (ФП) их растворов различного типа, от ФП 1 рода до непрерывных закритических. Для этого поведение температурных зависимостей стандартных термодинамических функций нативного (N) и денатурированного (D) белка в растворе рассмотрено в рамках представлений об избыточных функциях смешения. Предполагается, что N и D молекулы белка в конфигурациях случайных плотных упаковок и взаимодействия с водой способны формировать различные нанокристаллические суперрешетки, которые определяют топологические особенности структурированности их растворов в широком диапазоне температур. Это позволяет представить существование метастабильных фаз из молекул белка с промежуточными между N и D конформациями как результат взаимодействия с растворителем в низко- и высокотемпературных зонах. В координатах температура – стандартная энтропия и температура – плотность упаковки предложены обобщенные ФД раствора глобулярного белка с нижней и верхней критическими температурами смешения (НКТР и ВКТР) и однофазной закритической зоной между ними в диапазоне физиологических температур, характерной для раствора N- белка, и двухфазной замкнутой зоной для D-белка. Большой интерес представляет закритическая зона – область ФД между ВКТР и НКТР, где наравне с мономерами и олигомерами белка, находящихся преимущественно в N конформации, существуют мезоскопические кластеры белка, в которых молекулы белка имеют конформационное состояние, более близкое к D и формируют структуры жидкокристаллического типа. Процессы, происходящие в этой зоне, могут служить моделью физико-химического состояния белковой части клеточной протоплазмы, которую следует рассматривать в сопряжении с аналогичным состоянием межклеточной жидкости, в силу их совместных возможностей в регуляции гомеостаза в ответ на изменение температуры или состава системы [1].

Работа поддержана грантом РФФИ №13-03-00422.

1. Рожков, С.П., Горюнов, А.С., Биофизика, 2014, т.59, сс.54-60.

СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ И РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ**Protein folding and role of molecular chaperones*****Семисотнов Г.В.***

Институт белка РАН, 142290 г. Пущино Московской области, ул. Институтская, дом 4

E-mail: nina@vega.protres.ru

Выяснение механизма приобретения белками пространственной функционально активной конформации (или взаимосвязи первичной структуры белков с их пространственной организацией) является одним из важных направлений молекулярной биологии и биофизики. В настоящей работе представлен обзор результатов исследований процесса сворачивания белков *in vitro* и влияния на этот процесс молекулярного шаперонина клеток *Escherichia coli* GroEL/GroES. Определены основные стадии процесса сворачивания белков и охарактеризованы промежуточные состояния, накапливающиеся на этих стадиях, а также условия, понижающие неспецифическую агрегацию и повышающие выход правильно свернутых белков в процессах биосинтеза и ренатурации. Проанализированы данные по взаимодействию полипептидных цепей, лишенных жесткой третичной структуры, с молекулярным шаперонином GroEL и по влиянию его олигандов на это взаимодействие.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 14-24-00157.

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ТИМИДИНФОСФОРИЛАЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКА ПРИ ИХ СВЯЗЫВАНИИ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.

Computer-aided search for thymidine phosphorylase inhibitors and investigation of protein conformational changes induced by their binding

Сидоров-Бирюков Д.Д.1, Тимофеев В.И.1,2, Куранова И.П.1,2, Жухлистова Н.Е.1

1 – Институт Кристаллографии Российской Академии Наук, 119333, Москва, Ленинский проспект, 59

2 – НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Тел.: +7(499)135-62-20; e-mail: sbdd@bk.ru

Тимидинфосфорилаза (ТФ) вовлечена в процесс ангиогенеза, поэтому в тканях злокачественных опухолей, где ангиогенез протекает постоянно и очень интенсивно, концентрация ТФ повышена по сравнению с нормальными тканями. Развитие и рост опухолей зависят от запасного пути синтеза нуклеозидов. Ингибирование данного пути синтеза, катализируемого нуклеозидфосфорилазами, является одной из стратегий борьбы с раковыми заболеваниями, поэтому ТФ может служить белком-мишенью для поиска ингибиторов – потенциальных противоопухолевых препаратов [1, 2].

Первой частью данной работы было создание системы тимидинфосфорилазы в комплексе с субстратом тимидином и системы тимидинфосфорилазы в комплексе с ингибитором 3' азидотимидином методом молекулярного докинга. Полученные в процессе докинга координаты комплексов тимидинфосфорилазы с тимидином и 3' азидотимидином сравнивались с координатами, полученными при структурном исследовании и при совмещении структур тимидинфосфорилазы из *E.Coli* и из *St.Aureus*. При анализе результатов рентгеноструктурного исследования было показано, что субстрат (тимидин) и ингибитор (3'азидотимидин) по-разному ориентированы в активном центре фермента.

Во второй части работы были промоделированы методом молекулярной динамики конформационные изменения в молекуле тимидинфосфорилазы при связывании субстрата тимидина и ингибитора 3' азидотимидина во временном интервале 10 нс. Обнаружено, что связывание лигандов сопровождается движением полипептидной петли, закрывающей активный центр. Показано, что при связывании тимидина при температурах 300 К и 310 К подвижная петля закрывает активный центр, что соответствует переходу к закрытой конформации фермента. Показано, что при температуре 300 К в комплексе ТФ/3' азидотимидин активный центр фермента более открыт, чем в свободном ферменте. Закрытие активного центра посредством перемещения подвижной петли происходит только при температуре 310 К. При температуре 310 К в комплексе ТФ с 3' азидотимидином обнаружена диссоциация иона сульфата, связанного в фосфат-связывающем центре [3].

1. Usuki, K., Saras, J., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, vol. 184, p. 1311.

2. Timofeev, V., Abramchik, Y., et al., *Acta Cryst.*, 2014, vol. 70, pp. 1155-1165.

3. Sidorov-Biryukov, D., Timofeev, V., et al., *Proceedings of the 23rd International Laser Physics Workshop*, Sofia, Bulgaria, p. 3.18.

АЛЛОСТЕРИЯ В ДИМЕРНЫХ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНЫХ БЕЛКАХ iRFP713, iRFP682 И iRFP670 НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОХРОМОВ.

Allostery in dimeric near-infrared fluorescent proteins iRFP713, iRFP682 and iRFP670 engineered from bacterial phytochromes

Степаненко Олеся В.1, Бубликов Г.С.1, Балобан М.В.2, Щербакова Д.М.2, Кузнецова И.М.1, Туроверов К.К.1,3, Верхуша В.В.2,4

- 1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
- 2 – Медицинский Колледж им. Альберта Эйнштейна, 10461, Нью-Йорк, Моррис парк, 1300
- 3 – Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29
- 4 – Медицинский факультет, Университет Хельсинки, 00290, Хельсинки, Хаартманнкату, 8
Тел.: +7 (812) 297-19-57; e-mail: lvs@incras.ru

Разработка ближне-инфракрасных (NIR) флуоресцентных белков (FPs) на основе бактериальных фитохромов (BphPs) в последнее время получила существенное развитие в связи необходимостью создания генетически кодируемых NIR зондов для прижизненной неинвазивной визуализации тканей и органов, а также взаимодействия белков в тканях млекопитающих. Природным хромофором бактериальных фитохромов является биливердин (BV), содержащийся в достаточных количествах в клетках животных. BV связанный с BphP поглощает и флуоресцирует в так называемом «оптическом окне прозрачности» тканей животных и человека, где уже практически не поглощают свет гемоглобин и меланин, а поглощение света молекулами воды еще незначительно.

В настоящей работе исследованы спектральные свойства мутантных форм димерных флуоресцентных белков iRFP670, iRFP682 и iRFP713, имеющие цистеиновые остатки, способные связывать BV, как в PAS так и GAF доменах (Cys15 и Cys256, соответственно), имеющие цистеиновые остатки только в одном из доменов, и не имеющие этих цистеиновых остатков вовсе. Было показано, что спектральные свойства и прочность связывания хромофора определяются не столько принадлежностью белка к разным FPs, сколько локализацией цистеиновых остатков, способных связывать BV. Установлено что BV, встроенный в карман GAF домена и ковалентно связанный с Cys256 имеет более коротковолновые полосы поглощения и флуоресценции и более высокий квантовый выход по сравнению с BV, связанным ковалентно с Cys15 или с BV, встроенным в карман GAF домена, но не связанным с белком ковалентно. Обнаружено, что в белках с заменой Cys15Ser связывание молекулы BV с Cys256 в одном из мономеров аллостерически препятствует связыванию второй молекулы BV с Cys256 в другом мономере. Наличие Cys15 в PAS доменах оказывает существенное влияние на структуру GAF доменов, так что в этом случае BV связывается с Cys256 в GAF доменах обоих мономеров. Мутантные формы белков, содержащие два цистеиновых остатка Cys15 и Cys256, имеют наиболее узкие и самые коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции, самый высокий квантовый выход флуоресценции и самую высокую молекулярную яркость. Наиболее высокая молекулярная яркость (в 1.5 и в 1.2 раза выше, по сравнению с iRFP713 и iRFP670, соответственно) обнаружена *in vitro* и в животных клетках для мутантной формы iRFP713/V256C.

Работа поддержана грантами РФФИ 13-04-0814 (ИМК) и ERC-2013-ADG-340233 (BBB).

«ОБМЕН ДОМЕНОВ» КАК СПОСОБ ФОРМИРОВАНИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЫЧЬЕГО ОДОРАНТ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

“Domain swapping” as a pathway of organization of quaternary structure of bovine odorant-binding protein

Степаненко Ольга В.1, Рогинский Д.О.2, Степаненко Олеся В.1, Кузнецова И.М.1, Туроверов К.К.1,2

- 1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;
- 2 – Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Тел.: +7(812) 297-19-57; e-mail: sov@incras.ru

Бычий одорант-связывающий белок (bOVP) формирует уникальную димерную структуру посредством «обмена доменами», при этом каждая мономерная субъединица bOVP формирует классическую для OVP укладку при взаимодействии его β -бочонка с α -спиральным участком другой мономерной субъединицы. Предполагается, что такой способ формирования надмолекулярных белковых комплексов, обнаруженный для многих белков, несет существенную структурную и функциональную нагрузку – увеличение стабильности белка в целом, приобретение белком новых функций, не свойственных его мономерным формам, участие в процессах амилоидогенеза. Были исследованы процессы разворачивания – сворачивания рекомбинантного bOVP и двух его мутантных форм bOVP-Gly121+ и bOVP-Gly121+/W64C/H155C (GCC-bOVP), не склонных к димеризации посредством «обмена доменами». Рекомбинантный bOVP существует в стабильном нативо-подобном состоянии как смесь мономерных и димерных форм белка. Димерная форма bOVP образуется в присутствии достаточно высоких концентраций денатуранта. Этот процесс протекает с образованием стабильного, более компактного, промежуточного состояния bOVP. Разворачивание мономерных форм bOVP-Gly121+ и GCC-bOVP полностью обратимо и протекает через образование тех же состояний, которые были обнаружены в процессе денатурации рекомбинантного bOVP, при этом денатурационный переход для GCC-bOVP, стабилизированного дисульфидной связью, сдвинут в область больших концентраций денатуранта. Таким образом, путь разворачивания – сворачивания рекомбинантного bOVP и мутантных мономерных форм одинаков и не зависит от олигомерного статуса белка. Образование комплекса bOVP и его мономерными формами с природным лигандом 1-октен-3-олом (ОСТ) приводит к существенной стабилизации исследуемых белков, но не влияет на характер их разворачивания. Равновесные кривые денатурации и ренатурации комплекса bOVP/ОСТ не совпадают. Наличие гистерезиса свидетельствует о том, что процесс денатурации bOVP существенно осложнен процессом формирования правильного димерного состояния белка посредством «обмена доменами» и его скорость существенно зависит от условий, в которых находится белок. Димеризация белка посредством обмена доменов не вносит вклад в увеличение стабильности белка, как предполагалось ранее. Заметное стабилизирующее влияние оказывает внесение в структуру мономерного белка дисульфидной связи. Формирование комплекса всех белков с лигандом нивелирует исходную разницу в стабильности, вызванную различиями в структуре белков и приводит к существенной стабилизации всех исследуемых белков. Так же было исследовано влияние краудинг-агентов на структуру и процессы фолдинга рекомбинантного bOVP. Показано, что стабилизирующее действие на молекулу bOVP существенно зависит от размера и концентрации краудинг-агента.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-24-00131 (ККТ)

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТИОФЛАВИНА Т С АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА РАВНОВЕСНОГО МИКРОДИАЛИЗА**Investigation of thioflavin T binding to acetylcholinesterase with the use of equilibrium microdialysis****Сулацкая А.И.1, Кузнецова И.М.1, Рычков Г.Н.2,3, Туроверов К.К.1,2**

1 – ИНЦ РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

2 – ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

3 – ФГБУ «ПИАФ», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща

Тел.: +7(812)297-19-57; факс: +7(812)297-35-41; e-mail: ansul@mail.ru

Ацетилхолинэстераза (AChE) играет ключевую роль в холинергической синаптической передаче, а нарушение ее активности может привести к ряду тяжелых заболеваний. Флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT), который является специфическим маркером возникновения амилоидных фибрилл, эффективно используется для исследования структуры, активности и особенностей функционирования AChE. Однако на данный момент нет единого мнения о стехиометрии комплекса ThT-AChE, и, в частности, о возможности образования красителем эксимеров в связанном с ферментом состоянии [1]. Впервые для определения параметров связывания ThT с AChE и характеристик связанного с ферментом красителя был использован подход, основанный на подготовке исследуемых растворов методом равновесного микродиализа, который ранее был предложен нами для изучения взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами [2]. С использованием абсорбционной спектроскопии этих растворов была рассчитана стехиометрия связывания ThT с AChE (1:1). Кроме того впервые определен спектр поглощения ThT, связанного с AChE ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$), который, как оказалось, сдвинут в длинноволновую область по сравнению со спектром поглощения свободного красителя в водном растворе ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$). Более длинноволновое положение спектра поглощения ThT связанного с AChE может быть обусловлено большей гидрофобностью микроокружения этих молекул красителя. С использованием метода молекулярного моделирования показано, что угол между бензтиазольным и аминобензольным кольцами ThT, связанного с периферическим сайтом AChE ($\sim 39.7^\circ$), практически совпадает с углом между этими фрагментами для свободного красителя в водном растворе ($\sim 37^\circ$). Флуориметрическое исследование растворов, полученных методом равновесного микродиализа, позволило показать, что положение спектров флуоресценции свободного и связанного с AChE красителя совпадают, а возрастание квантового выхода флуоресценции ThT при взаимодействии с ферментом может быть объяснено молекулярно-роторной природой ThT. Полученные результаты в совокупности с информацией о стехиометрии связывания ThT с AChE свидетельствуют о необоснованности гипотез об образовании связанным красителем эксимеров [1]. Сравнение аффинности взаимодействия ThT с AChE и с амилоидными фибриллами (для которых ранее уже была доказана мономерная модель связывания красителя [3]), а также анализ фотофизических свойств связанного ThT, позволили сделать заключение о сходном механизме этих взаимодействий, а также предположить ключевую роль во взаимодействии ThT с AChE ароматических остатков, что характерно для взаимодействия ThT с некоторыми амилоидными фибриллами.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-90024_Бел, 13-04-02068, Программой "МКБ" РАН и стипендией Президента РФ СП-1982.2015.4.

1. Groenning, M., Olsen, L., et al., J. Struct. Biol., 2007, vol. 158, pp. 358-369.
2. Kuznetsova, I.M., Sulatskaya, A.I., et al., Molecular neurobiology, 2012, vol. 45, pp. 488-498.
3. Sulatskaya, A.I., Turoverov, K.K., and Kuznetsova, I.M., Spectroscopy, 2010, vol. 24, pp. 169-171.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ТИОФЛАВИНА Т

Examination of amyloid fibrils structure using fluorescent dye thioflavin T

Сулацкая А.И.1, Кузнецова И.М.1, Туроверов К.К.1,2

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

2 – ФГБОУ ВПО «СПбГПУ», 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

Тел.: +7(812) 297 19 57; e-mail: kkt@incras.ru

Флуоресценция тиюфлавина Т (ThT) уже около пятидесяти лет успешно используется для диагностики возникновения амилоидных фибрилл, образование которых сопутствует развитию тяжелых заболеваний человека: болезни Альцгеймера и Паркинсона, прионных заболеваний и еще более 25 других заболеваний. В последнее десятилетие ThT стал не только средством тестирования образования амилоидных фибрилл, но и инструментом для изучения их структуры и механизмов образования, что крайне актуально не только для молекулярной медицины, но также для получения новых знаний в области фолдинга белков и, в связи с исключительными прочностными характеристиками амилоидных фибрилл, для материаловедения.

Очевидно, что успех использования ThT для изучения структуры амилоидных фибрилл в значительной мере зависит от того, насколько хорошо поняты фотофизические свойства красителя и механизм его взаимодействия с фибриллами. Большинство исследователей придерживаются той точки зрения, что ThT встраивается в фибриллы в мономерной форме и что основным фактором, определяющим существенное (в некоторых случаях в несколько тысяч раз) возрастание квантового выхода его флуоресценции, является ограничение подвижности фрагментов молекулы красителя (бензтиазольного и аминобензольного колец) друг относительно друга в возбужденном состоянии. Тем не менее, регулярно появляются статьи, в которых возрастание интенсивности флуоресценции ThT при его встраивании в амилоидные фибриллы связывают с агрегацией молекул красителя: образованием димеров, эксимеров и даже мицелл. Целью настоящей работы стало сравнительное изучение спектральных свойств ThT, встроенного в амилоидные фибриллы, и свободного красителя в водном растворе в широком диапазоне его концентраций.

Решение этой задачи было бы невозможно без использования спектрофлуориметра Cary Eclipse, который позволяет работать с растворами с практически сколь угодно высокой оптической плотностью, и специального подхода, разработанного нами для учета эффекта внутреннего фильтра [1]. В настоящей работе впервые были определены спектральные свойства ThT в диапазоне его концентраций от $3 \cdot 10^{-6}$ до $3 \cdot 10^{-2}$ М (что соответствует оптическим плотностям раствора от 0.1 до 1000). Было показано, что в водном растворе ThT может образовывать эксимеры, однако их спектральные характеристики существенно отличаются от флуоресценции ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы. Сделан вывод о том, что флуоресценция ThT, связанного с фибриллами, обусловлена его мономерной формой. Выполнение данной работы демонстрирует широкий потенциал предложенного нами метода для изучения взаимодействия флуоресцентных красителей, образования димеров, эксимеров, коцентрационного самотушения, влияния эффектов внутреннего фильтра на спектральные характеристики хромофора и его квантовый выход.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-08-90024_Bel (ККТ), 13-04-02068 (АИС), Программой МКБ РАН, Стипендией Президента РФ СП-1982.2015.4 (АИС).

1. Fonin, A.V., Sulatskaya, A.I., Kuznetsova, I.M., and Turoverov, K.K., Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction, PLoS ONE, 2014, vol. 9, no. 7, p. e103878.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СОПОЛИМЕРОВ НА ГРАФЕНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛАМИ**Changes in structural and dynamic characteristics of copolymers on alkyl hydroxy benzenes-modified graphene sheet****Терешкина К.Б., Крупянский Ю.Ф.**

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4
Тел.: +7(495)939-73-00; e-mail: ksenia.tereshkina@gmail.com

В данной работе изучаются процессы самоорганизации белковоподобных сополимеров на графеновой подложке в присутствии ряда алкилоксибензолов (АОБ). Исследования проводятся методами молекулярной динамики и квантовой механики. В настоящее время актуальным направлением исследований является создание систем с иммобилизованными белками-ферментами, обладающими заданными свойствами. Известно, что АОБ могут оказывать существенное влияние на функциональную активность, как отдельных белков, так и белковых комплексов, их динамические и структурные характеристики [1, 2].

Методами квантовой механики HF/6-311G(d,p), MP2/6-311G(d,p), MP2/aug-cc-pVQZ в программе Firefly [3] исследованы процессы адсорбции десяти различных молекул АОБ и ряда малых молекул на участке графена, состоящем из 96 атомов углерода. Показано, что адсорбция молекулы АОБ вызывает поляризацию нейтральной π -системы, приводит к возникновению парциальных атомных зарядов, альтернированных на соседних атомах углерода от -0.3 до +0.3 (в единицах заряда электрона, параметризованного для силового поля OPLS-AA) для АОБ с минимальными боковыми заместителями. Найдены энергии десорбции АОБ с поверхности графена.

Изучение эволюции систем сополимеров с АОБ и графеном проводилось методами молекулярной динамики в программном комплексе Gromacs [4] с использованием силового поля OPLS-AA. В качестве моделей белка-фермента были созданы coarse grained модели лизоцимоподобных сополимеров, состоящие из двух (AB) и пяти (ABCDE) типов мономеров, позволяющие на разумных временах проследить эволюцию сополимерной цепи. Силовые поля АОБ и графена получены на основании данных квантово-механических расчётов. Обнаружены различия в адсорбции молекул для двух моделей сополимеров. Показано, что молекулы алкилоксибензолов оказывают влияние как на параметры адсорбции сополимеров, так и на структурно-динамические характеристики белковоподобных молекул. Обнаружено, что молекулы АОБ способны стабилизировать пространственную структуру сополимера при его взаимодействии с графеном. Получены структурные и энергетические данные изученных систем.

1. Нокс, П.П.; Лукашев, Е.П., и др., Микробиология, 2010, т. 79, вып. 2, сс. 286-288.
2. Терешкина, К.Б., Степанов, А.С., Сеницын, Д.О., и Крупянский, Ю.Ф., Химическая физика, 2014, т. 33, вып. 7, сс. 1-10.
3. Granovsky, A.A., Firefly version 8, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.
4. Hess, B., Kutzner, C., Van der Spoel, D., et al., J. Chem. Theory Comput., 2008, vol. 4, p. 435.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ (АЛКИЛРЕЗОРЦИНОВ) НА СТРУКТУРУ И ДИНАМИКУ ЛИЗОЦИМА И ИММОБИЛИЗОВАННОГО ЛИЗОЦИМОПОДОБНОГО ПОЛИМЕРА

The influence of alkylresorcinols on structure and dynamics of lysozyme and lysozyme-like immobilized copolymer

Терешкина К.Б.1, Степанов А.С.1, Сеницын Д.О.1, Лойко Н.Г.2, Эль-Регистан Г.И.2, Крупянский Ю.Ф.1

1 – Институт химической физики им Н.Н.Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

2 – Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, Проспект 60-летия Октября, 7, к.2

Тел.: +7(495) 939-73-00; e-mail: yufk@chph.ras.ru

Алкилрезорцины интересны тем, что они, при определенных концентрациях, быстро вызывают переход микробных клеток из вегетативного состояния в покоящееся (анабиотическое). Естественно полагать, что столь сильно действующие биологически активные вещества – гексил- и метилрезорцины должны влиять на структуру, динамику и функциональные свойства белков.

Исследовано влияние гексилрезорцина и метилрезорцина в большом диапазоне их концентраций на структуру, равновесные флуктуации и функциональную активность лизоцима. Гексилрезорцин и метилрезорцин сильно различаются по структуре и своему действию на лизоцим.

При малых концентрациях гексилрезорцина активность лизоцима резко возрастает, с ростом концентрации активность начинает падать. При концентрации выше 100 молекул на глобулу активность лизоцима полностью ингибируется. Этот эффект вызван предпочтительной гидратацией белка с вытеснением гексилрезорцина из непосредственного контакта с белком. Вытеснение гексилрезорцина приводит к образованию мицелл высокой плотности из молекул гексилрезорцина вокруг глобулы. Плотные мицеллы мешают прохождению субстрата к белку, и полностью ингибируют функциональную активность лизоцима.

Метилрезорцин взаимодействует с поверхностными аминокислотами лизоцима непосредственно, а не через водородные связи воды. С увеличением концентрации молекулы метилрезорцина образуют своеобразное дерево вокруг глобулы белка. Флуктуирующая структура молекул метилрезорцина приводит к увеличению радиуса гирации белка, понижению температуры денатурации T_d , увеличению амплитуды равновесных флуктуаций. Эти причины позволяют метилрезорцину быть мощным активатором лизоцима.

Изучался также процесс самоорганизации белковоподобных сополимеров без подложки, на графеновой подложке, в отсутствие и присутствии ряда алкилрезорцинов. Были созданы coarsegrained модели лизоцимоподобных сополимеров, состоящие из двух (AB) и пяти (ABCDE) типов мономеров. Обнаружены различия в адсорбции молекул для двух моделей сополимеров. Показано, что молекулы алкилоксибензолов оказывают влияние, как на параметры адсорбции сополимеров, так и на структурно-динамические характеристики белковоподобных молекул. Обнаружено, что молекулы АОБ способны стабилизировать пространственную структуру сополимера при его взаимодействии с графеном.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ СИМУЛЯТОР АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**A computer simulator of mammalian cytochrome c oxidase activity*****Тимова В.Ю.1, Бороновский С.Е.1 Ransac S.2, Нарциссов Я.Р.1, Mazat J.P.2****1 – НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-ая Радиальная, д.24, стр.14**2 – UniversiteBordeaux 2, 1 rueCamilleSaint-Saëns, 33077 Bordeaux-cedex, France**Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail:yarosl@biotic.dol.ru*

Цитохром с-оксидаза – важнейший фермент, катализирующий восстановление кислорода в цепи окислительного фосфорилирования. Параллельно с этим процессом происходит трансмембранная перекачка протонов, что позволяет рассматривать цитохром с-оксидазу в качестве первичного генератора электрохимического потенциала, поставляющего энергию для синтеза АТФ. Каталитический цикл цитохром с-оксидазы может быть представлен в виде цепочки переходов между различными состояниями бинуклеарного центра, которые сопровождаются как переносом электронов и протонов, необходимых для синтеза воды, так и трансмембранным транспортом протонов. При этом применение классического подхода, основанного на кинетическом моделировании, представляется затруднительным в силу существенного различия между данными процессами. Несмотря на то, что структура белка и некоторые локальные характеристики уже детально исследованы, многие кинетические параметры цикла до сих пор неизвестны, что также усложняет построение модели совмещающей в себе описание электронного и протонного транспорта. Данная работа посвящена компьютерному симулятору активности цитохром с-оксидазы, основанному на стохастическом представлении транспорта электронов и протонов через фиксированные центры для единичного белка. Схема переноса метаболитов в бинуклеарный центр реализована с использованием имитационного моделирования в непрерывном времени, что дает возможность нивелировать различие между характеристическими временными шкалами для каждого из процессов. Были получены потоковые характеристики цитохром с-оксидазы при различном парциальном давлении кислорода в системе. В условиях насыщения скорость синтеза воды практически неизменна и составляет 395 с^{-1} , однако, эффективность работы, т.е. отношение числа помпированных протонов к числу перенесённых в бинуклеарный центр электронов, может варьироваться от 0.9 до 1, что обусловлено внутренней регуляцией пропускной способности выходного протонного канала.

ESCHERICHIA COLI КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В ИССЛЕДОВАНИИ РЕГУЛИРУЕМОГО ПРОТЕОЛИЗА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Escherichia coli as the modelling object in studies regulated proteolysis of the supramolecular biochemical processes

Тропынина Т.С., Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Иванов Р.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии РАН, 450054, Уфа, пр. Октября, 69

Телефон (347)2355362; факс (347)2356247; e-mail:evilina@anrb.ru

Протеолиз является одним из этапов регуляции экспрессии генома в онтогенезе клетки. В бактериях выделяют общий и регулируемый протеолиз [1]. Мы исследуем локализацию Arg-X протеазочувствительных зон на разных надмолекулярных уровнях структурной укладки нуклеоида прокариотической клетки в фазы: активного роста, замедления и перехода к остановке [2] на примере популяции клеток *E. coli*. Клетки выращивали в жидкой среде LB [3] в течение 430 мин при 37°C 160 об/мин до остановки роста. В процессе инкубирования из культуры, с интервалами в 20 мин, отбирали клетки, которые фиксировали [4]. Из клеток выделяли надмолекулярные структуры: цитоплазмы, непрочносвязанные с клеточным остатком, прочносвязанные с клеточным остатком и клеточный остаток [5]. Из надмолекулярных структур, методом аффинной хроматографии, выделяли трипсиноподобные протеиназы и их ингибиторы. «Кислые» и основные белки выделяли методом ионообменной хроматографии, из которых вновь выделяли трипсиноподобные протеиназы. Количество белка определяли методом Бредфорд с модификациями [6]. Arg-X активность оценивали по расщеплению Arg-X связей в аргининбогатом белке – протамине – Salmine-A-I («Merk»). Таким образом, была выявлена динамика Arg-X активности в надмолекулярных структурах фаз роста периодической культуры *E. coli*. Выявление активности Arg-X протеолиза в надмолекулярных структурах клеток популяции *E. coli* в фазах роста периодической культуры может служить источником информации о том, где ослаблена связь белков с ДНК и где возможно образование пула пептидов и биогенных аминов, несущих определенную сигнальную информацию для организма в целом.

1. Schmidt, R., Bukau, B., and Mogk, A., Res. Microbiol., 2009, vol. 160, pp. 629-636.
2. Хмель, И.А., Генетика, 2005, т. 41. вып.9, сс. 1183-1202.
3. Маниатис, Т., Фрич, Э., и Сэмбрук, Дж., М.: Мир, 1984, с. 84.
4. Иванова, Э.А. и Вафина, Г.Х., А.с. 1701747, МКИ С12 N9/50, опубл. 01.09.91, бюл. №48.
5. Иванова, Э.А., Вафина, Г.Х., и Тропынина, Т.С., Патент № 2410428. МПК С12N 9/16; С12P 1/04, опубл. 27.01.2011, бюл. № 3.
6. Иванова, Э.А. и Вафина, Г.Х., А.с. 1733471, МКИ С12 N9/50, опубл. 15.01.92, бюл. №18.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОГО КОМПЛЕКСА БЕЛКОВ ПЛАСТОЦИАНИНА И ЦИТОХРОМА F**Intermediate states of plastocyanin and cytochrome f electron-transport protein complex formation****Федоров В. А., Хрущев С. С., Коваленко И.Б.**

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12
+7(495)9390289, xbgth@yandex.ru

Короткоживущие белок–белковые комплексы играют важную роль в различных процессах, протекающих в живой клетке. Формирование короткоживущих комплексов происходит при активации и ингибировании ферментативной активности, в процессе рецепции и передачи информации, при окислительно-восстановительных реакциях и др. В данной работе на основе вычислительного эксперимента производится реконструкция процесса сближения молекул белков и проводится идентификация промежуточных состояний. Предложен оригинальный подход к реконструкции последовательности событий, происходящих при диффузионном сближении белков, с использованием методов броуновской и молекулярной динамики и иерархического кластерного анализа [1]. Было получено множество электростатически выгодных взаимных расположений белков, соответствующее состоянию диффузионного захвата, и установлены наиболее типичные структуры таких комплексов. Применение предложенного метода позволило качественно описать последовательность событий, предшествующих формированию функционально-активного комплекса этих белков. Использование метода молекулярной динамики в рамках единого комплексного подхода позволило провести полную реконструкцию процесса образования функционально-активного белок-белкового комплекса из диффузионно-столкновительного комплекса. Данный вычислительный эксперимент позволил определить стадии предшествующие образованию функционально-активного комплекса белков пластоцианина и цитохрома f и установить возможные пути эволюции промежуточных, метастабильных состояний [2]. Эти состояния обусловлены высокой электростатической взаимной специфичностью белков, необходимой для обеспечения высокой скорости формирования короткоживущих белок-белковых комплексов. Вычислительные эксперименты проводились с использованием суперкомпьютера Ломоносов в Суперкомпьютерном центре Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова [3].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты 15-07-08927, 14-04-00302 и 15-04-08681.

1. Хрущев, С.С., Абатурова, А.М., Дьяконова, А.Н., Устинин, Д.М., Зленко, Д.В., Федоров, В.А., Коваленко, И.Б., Ризниченко, Г.Ю., и Рубин, А.Б., Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim, Компьютерные исследования и моделирование, 2013, т. 5, вып. 1, сс. 47-64.
2. Хрущев, С.С., Абатурова, А.М., Федоров, В.А., Коваленко, И.Б., Ризниченко, Г.Ю., и Рубин, А.Б., Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электронтранспортных белков пластоцианина и цитохрома f, Биофизика, 2015, т. 60, вып. 4.
3. Воеводин, В.В., Жуматий, С.А., Соболев, С.И., Антонов, А.С., Брызгалов, П.А., Никитенко, Д.А., Стефанов, К.С., и Воеводин, В.В., Практика суперкомпьютера "Ломоносов", М.: Открытые системы, 2012, вып. 7, сс. 36-39.

ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГ-АГЕНТОВ ВЫСОКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НА ПУТЬ СВОРАЧИВАНИЯ/РАЗВОРАЧИВАНИЯ D-ГАЛАКТОЗА/D-ГЛЮКОЗА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА (GGBP) И АФФИННОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ С НИМ ГЛЮКОЗЫ

High molecular mass crowders affect the folding pathway and the affinity of glucose to D-galactose/D-glucose-binding protein (GGBP)

Фонин А.В.1, Силонов С.А.1, Ситдикова А.К.1,2, Кузнецова И.М.1, Туроверов К.К.1,2

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4

2 – ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29 Тел.: +7(812) 297 19 57; e-mail: alexfonin@incras.ru

Белки существуют и функционируют в клетке в условиях молекулярного краудинга, т.е в условиях, когда свободный объем, незанятый другими молекулами, существенно ограничен. Для моделирования условий краудинга *in vitro* используются высококонцентрированные растворы инертных полимеров (краудинг-агентов). Известно, что условия краудинга оказывают существенное влияние на структуру, стабильность и фолдинг белков [1]. В настоящей работе было исследовано влияние одного из краудинг-агентов – полиэтиленгликоля (PEG) различной молекулярной массы (от 0.6 до 12 кДа) на стабильность D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка (GGBP) и его взаимодействие с глюкозой при различных концентрациях PEG. GGBP – небольшой глобулярный двухдоменный белок, разворачивание которого под действием денатурантов в отсутствие PEG обратимо и осуществляется по принципу «все или ничего». Показано, что PEG высокой молекулярной массы (4 и 12 кДа) при высоких концентрациях (200 и 300 мг/мл) способствует увеличению содержания вторичной структуры GGBP и сдвигу денатурационных кривых в область больших концентраций химического денатуранта – гуанидингидрохлорида (GdnHCl). При этом кривые зависимости молярной эллиптичности при 222 нм от концентрации GdnHCl в растворах PEG 12 кДа и 4 кДа при концентрациях 300 и 200 мг/мл имеют выраженный локальный минимум около 2 M GdnHCl. Это может свидетельствовать о существовании в этой области концентраций денатуранта промежуточного состояния GGBP с более высоким, по сравнению с развернутым белком, содержанием вторичной структуры. Установлено, что кривые денатурации и ренатурации GGBP в растворах PEG 12 кДа и 4 кДа при концентрациях 300 и 200 мг/мл не совпадают. Показано, что спектры кругового дихроизма GGBP в растворах низких концентраций GdnHCl, полученные при ренатурации белка в высоких концентрациях PEG высокой молекулярной массы значительно отличаются как по форме, так и по интенсивности от спектров КД в этих же условиях, полученных при денатурации белка. В совокупности, полученные данные позволяют предположить, что PEG высокой молекулярной массы (4 и 12 кДа) при его высоких концентрациях (200 и 300 мг/мл) способствует изменению поверхности свободной энергии GGBP и изменяет путь как сворачивания, так и разворачивания белка. Изменение флуоресцентного сигнала красителя BADAN, присоединенного к мутантной форме GGBP/H152C при взаимодействии этого белка с глюкозой было использовано для изучения влияния высококонцентрированных растворов PEG различной молекулярной массы на аффинность связывания GGBP с глюкозой. Показано, что сродство глюкозы к GGBP увеличивается при увеличении молекулярной массы PEG и его концентрации в растворе. Обсуждается механизм влияния PEG на стабильность и функциональную активность GGBP.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 14-24-00131)

1. Kuznetsova, et al., 2014, Int. J. Mol. Sci., vol. 15, pp. 23090-23140.

СТРУКТУРА ДЕФЕНЗИНА 1 СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ПО ДАННЫМ ЯМР И ИК-СПЕКТРОСКОПИИ**NMR and IR spectroscopy of Scots pine defensin 1**

Хайрутдинов Б.И., Тарасова Н.Б., Топоркова Я.Ю., Файзуллин Д.А., Ермакова Е.А., Гоголев Ю.В., Зувев Ю.Ф

Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31

Тел.: +7(843)231-90-37; факс: +7(843)292-73-47; e-mail: khayrutdinov@yahoo.com

Дефензины — низкомолекулярные (3.5-6.0 кДа) богатые цистеином катионные пептиды иммунной системы, обладающие биологической активностью в отношении к некоторым видам бактерий и низших грибов. Несмотря на широкое распространение дефензинов и их активную роль в биологических процессах, механизм их действия остается мало изученным.

В данной работе методы ИК-, КД- и ЯМР спектроскопии высокого разрешения применены для исследования структуры дефензина PsDef-1 сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*).

Разработана оригинальная методика наработки рекомбинантного белка PsDef-1: подобраны условия экспрессии, выделения, очистки и хранения. Определены условия (температура, значение pH раствора) проведения ЯМР эксперимента.

Методами ИК- и КД- спектроскопии определена доля элементов вторичной структуры. Показано, что КД спектр дефензина является типичным для белков типа α/β . ИК- и КД данные показывают, что PsDef-1 имеет хорошо определенную, стабильную структуру, доля α -спирали составляет 20%, β -слоев — около 30% структуры.

Методом ЯМР спектроскопии высокого разрешения получена модель трехмерной структуры белка дефензина PsDef-1 сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*). Отнесение сигналов производилось на основе серии двумерных гомо- и гетерокорреляционных спектров: 1H-1H-COSY, 1H-1H-TOCSY, 1H-13C-HSQC, 1H-13C- TOCSY-HSQC, 1H-13C-HMBC, и 1H-1H-NOESY. Анализ значений химических сдвигов ядер основной цепи (H, Ha, Ca, Cb, CO) с помощью программы TALOS позволил выявить наличие элементов упорядоченной вторичной структуры. Для расчета трехмерной модели использовались значения двугранных углов ϕ и ψ полученные программой TALOS, и интегральные интенсивности кросс-пиков ядерного эффекта Оверхаузера полученные из спектра 1H-1H-NOESY. Выявлено, что структура исследуемого дефензина имеет α/β -укладку характерную для дефензинов растений. Соотношение элементов вторичной структуры согласуется с экспериментальными данными ИК-спектрометрии и спектроскопии КД.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта №15-44-02309

ФАКТОР FVIII СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ В ЦЕНТРЕ СВЯЗЫВАНИЯ МЕДИ

Human coagulation factor VIII: quantum chemical modelling of the mutations in Cu-binding site

Чижов Ю.В.1, Маслов В.Г.2, Мошков К.А.1, Стефанов В.Е.1

1 – Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7-9

2 – Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 107101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр-кт, д.49

Тел.: +7(812)428-75-00; Факс: +7(812)428-72-40 (НИИ физики); e-mail: yurichizhov@yandex.ru, maslov04@bk.ru, k.moshkov@spbu.ru, v.stefanov@spbu.ru.

Актуальность структурно-функционального изучения фактора VIII (FVIII) свертывания крови человека обусловлена тем, что в основе моногенного заболевания, гемофилии типа А, лежат многочисленные (более 2000) дефекты гена этого белка. Зрелая форма FVIII (одноцепочечный полипепид, 2332 остатка) образована шестью доменами: A1-A2-A3-B-C1-C2. В доменах A1 и A3 выявлены остатки, связывающие ион Cu: His267, His315, Cys310 и соответственно His1954, His2005, Cys2000 [1]. Расположение этих остатков в цепи FVIII обнаруживает заметную степень гомологии с расположением таких же остатков в Cu-связывающих центрах в ряду эволюционно удаленных медьпротеидов – от низкомолекулярных (бактериальных азуринов и растительных пластоцианинов и др.) до высокомолекулярных (церулоплазмин животных; ЦП). В то же время нами путем сопоставительного анализа показана значительно более низкая степень совпадения остатков FVIII, которые находятся в положениях, соответствующих остаткам, которые формируют Cu-связывающие центры иной природы в ЦП. Этот факт можно объяснить тем, что указанные остатки в FVIII не участвуют в связывании иона меди, не неся функциональной нагрузки и, тем самым, подвержены действию эволюционного процесса [2]. В пользу функциональной значимости Cu-связывающего центра в домене A1 свидетельствует тот факт, что одна из мутаций, а именно Cys310Phe, локализованная в этом центре, приводит к гемофилии в тяжелой форме [3]. В связи с этим нами было проведено исследование свободных комплексов, моделирующих центр связывания иона меди как в низкомолекулярных медьпротеидах (азурин), так и в FVIII (домен A1) методом стационарной теории функционала плотности с использованием лицензионной программы GAUSSIAN09, установленной в Вычислительном Центре Санкт-Петербургского государственного университета. Расчеты проводили с применением обменно-корреляционного функционала b3pw91, хорошо зарекомендовавшего себя при анализе пи-комплексов переходных металлов. Для описания атома Cu в составе комплексов использовали псевдопотенциал LanL2DZ, для атомов H – полные базисы 6-31++G**, для атомов C, O, N и S – 6-31G(d). Все расчеты проводились с полной оптимизацией геометрии. Анализ результатов процедуры оптимизации показал, что замещение остатка Cys на Phe приводит к существенному искажению геометрии комплекса. Мы предполагаем, что такое искажение может являться главной причиной деформации белковой глобулы, вызывающей, в свою очередь, нарушение образования комплекса FVIII с его физиологическим партнером, фактором FIX, в ходе каскадного процесса свертывания крови.

1. Ngo, J.C.K., Huang M., et al., Structure, 2008. vol. 16, pp. 597-606.

2. Мошков, К.А., Маслов В.Г., и Стефанов В.Е., Ж. Эвол. Биохим. Физиол., 2015, т. 51, с. 136-139. www.factorviii-db.org.

БЕЛКОВАЯ ТОПОГРАФИЯ: НОВЫЙ МЕТОД ДИЗАЙНА ВЫСОКОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ НА ПРИМЕРЕ АНАЛОГОВ А-КОНОТОКСИНА PnIA — ЛИГАНДА НИКОТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА

Protein topography: a new design method of highly active peptides, using, as example, analogues of A-conotoxin PnIA, which is a ligand of human nicotine receptors

Чугунов А.О.1, Табакмахер В.М.2, Кудрявцев Д.С.1, Иванов И.А., Жмак М.Н., Кашеверов И.Е.1, Цетлин В.И.1, Ефремов Р.Г.1,3

1 – Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

2 – Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Владивосток

3 – Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва

Направленный дизайн биоактивных молекул до сих пор остается скорее искусством, нежели рациональной методикой, в то время как наработки структурной и компьютерной биологии уже позволяют подвести достаточно надежную базу под эту задачу. Недавно мы разработали алгоритм «белковой топографии» [1], основанный на построении сферических карт-разверток молекул биоактивных пептидов для выявления взаимосвязи структура–свойства–функция для этих объектов.

В этой работе мы применили белковую топографию для создания на структурном каркасе α -конотоксина PnIA нескольких лигандов никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR), а также ацетилхолин-связывающего белка, обладающих наномолярной аффинностью. Компьютерные предсказания были подтверждены данными радиолигандного анализа. Основой для рационального дизайна стал набор биохимических данных по взаимодействию нескольких конотоксинов и их мутантов с названными мишенями, а метод белковой топографии позволил выявить ключевые точки на поверхности пептидов, внесение замен в которые усиливает связывание и увеличивает селективность.

Полученные соединения могут быть не только эффективными инструментами исследования nAChR, но и применяться в терапии связанных с этими мишенями заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, шизофрения и др.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-31634 и грантом Президента 6310.2015.4.

1. Koromysova, A.D., Chugunov, A.O., and Efremov, R.G., Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method, J. Chem. Inf. Model., 2014, vol. 54, pp. 1189-1199.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ

Study of thermal stability of peroxiredoxins

Шарапов М.Г., Пеньков Н.В., Новоселов В.И.

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Московская обл., Пущино, 142290, ул.

Институтская 3

e-mail: sharapov.mars@gmail.com

Пероксиредоксины (Prx) – антиоксидантные ферменты, способные восстанавливать гидропероксиды как органической, так и неорганической природы. Кроме того, некоторые Prx проявляют шаперонную, фосфолипазную активность и участвуют в передаче внутри- и межклеточных сигналов. У млекопитающих обнаружено 6 типов пероксиредоксинов Prx1-6.

Получены рекомбинантные пероксиредоксины (Prx1-6) человека и проведена их сравнительная физико-химическая характеристика. Наиболее активными среди полученных ферментов по отношению к гидропероксидам являются Prx1 и Prx2. Для оценки термостабильности Prx1-6 человека, белки прогревали от 37 до 70°C в течение 30 мин, затем определяли остаточную активность. Ферменты Prx3,4,5,6 достаточно близки по термостабильности, 50% активности ферменты сохраняют после 30 мин прогревания при температуре ~ 50°C, для Prx1 и Prx2 это значение ~ 64°C. Все пероксиредоксины имеют общую тиоредоксиновую укладку и их трехмерная структура довольно консервативна. Чтобы понять природу такой разницы в термостабильности достаточно близких по структуре белков мы использовали физические методы исследования. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии на базе калориметра NanoDSC (TA Instruments, США) исследовали тепловую денатурацию белков: Prx1 и Prx6. Растворы белков [1 мг/мл] в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.4) нагревали с постоянной скоростью 1 К/мин (от 20 до 100 °C) и определяли изменение избыточной теплоемкости в зависимости от температуры. Начало денатурации Prx1 наблюдается при 64°C, а Prx6 при 51°C. Дополнительно исследовали температурные зависимости интенсивности рассеяния света и среднего гидродинамического диаметра (R) частиц в растворах Prx1 и Prx6 с помощью установки Zeta Sizer nano ZS (Malvern, Великобритания), что позволяет оценить агрегационные процессы в ходе плавления белков. Рост интенсивности рассеяния света для Prx6 наблюдается при 49°C, а для Prx1 при 58°C. Начало роста значения R для Prx6 = 46°C, а для Prx1 = 60°C. Мы предположили, что разница в термостабильности Prx1 и Prx6 связана с их четвертичной структурой, т.к. Prx1 (в отличие от Prx6) способен образовывать олигомеры с межмолекулярными дисульфидными (S-S) связями, что может привести к росту стабильности структуры. Для проверки этой гипотезы мы провели исследования тепловой денатурации Prx1 и Prx6 в присутствии восстановителя S-S связей дитиотреитола (ДТТ). При добавлении 10 мМ ДТТ к раствору Prx6 изменений в термостабильности не происходит. При добавлении 10 мМ ДТТ к раствору Prx1 его термостабильность становится похожей на Prx6. Таким образом, высокая термостабильность Prx1 и Prx2 обусловлена стабилизацией олигомерных структур за счёт межмолекулярных S-S связей. Полученные результаты, позволяют понять механизмы высокой термостабильности Prx1 и Prx2, которые при стрессовых условиях проявляют шаперонную активность и препятствует термической агрегации белков клетки.

Работа поддержана РФФИ №12-04-01086-а, №15-04-04021-а.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ QM-АНАЛИЗ СТРУКТУР 20 ПРОТЕИНОГЕННЫХ L-АМИНОКИСЛОТИ ИХ КРЕМНИЕВЫХ АНАЛОГОВ**Comparative QM-analysis of structures of 20 proteinogenic L-amino acids and their silicon analogs****Щербаков К.А.1, Кабанов А.В.2, Комаров В.М.2, Кондратьев М.С.2**

1 – Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, 424000, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина 1

2 – Институт биофизики клетки РАН, Пущино, 142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)73-05-19; факс: +7(4967) 33-05-09; e-mail: kirill.soff@gmail.com

Соединения на основе кремния часто фигурируют в теориях, описывающих неуглеродные формы жизни. В самом деле, электронные конфигурации валентных оболочек кремния и углерода аналогичны. Кремний четырёхвалентен и теоретически способен образовывать сложные, разветвлённые молекулы.

По этим причинам интерес представляет изучение кремниевых аналогов протеиногенных аминокислот, которые и послужили объектом нашего исследования. Целью исследования являлся поиск энергетических минимумов, и соответствующих им конформеров, кремниевых и углеродных аминокислот. В качестве молекулярного конструктора был использован пакет HyperChem 7.5.2. Первичная оптимизация структур проводилась в HyperChem посредством молекулярной механики (AMBER). На втором этапе структуры изучаемых молекул рассчитывались с помощью квантово-механического (QM) пакета MORAC 6 с параметризацией PM3. Нами были получены геометрически оптимизированные структуры всех 20 протеиногенных аминокислот и их кремниевых аналогов. В случае с кремниевыми аминокислотами, метод PM3 оказался недостаточно приемлемым: некоторые валентные углы в ходе оптимизации становились острыми. В связи с этим, уже найденные минимумы кремниевых и углеродных аминокислот были пересчитаны в MORAC 2012 с использованием параметризации PM7.

В результате расчета и последующего сравнительного анализа можно заключить, что разница между значениями энергетических минимумов одних и тех же углеродных аминокислот, рассчитанных в PM3 и PM7, является достоверно незначительной. Для кремниевых же аминокислот, разница между значениями энергетических минимумов являлась более заметной. 83% минимумов являлись более глубокими при использовании параметризации PM7.

При сравнении значений энергетических минимумов углеродных и кремниевых аминокислот, рассчитанных в PM3, считаем важным отметить, что большинство кремниевых аминокислот характеризуются более глубокими минимумами.

При вычислениях в PM7, отрицательные экстремумы теплот образования кремниевых аминокислот оказались более выраженными, чем эти же величины для углеродных. При оптимизации кремниевых аминокислот с использованием PM7, удалось получить для них реалистичную геометрию, в связи с чем использование PM7 представляется более предпочтительным для этого класса соединений.

Также были проведены геометрическая оптимизация и поиск энергетического минимума для кремниевого и углеродного пептида в конформациях альфа-спирали и бета-листа, состоящего из 12 остатков Ala. При вычислениях и в PM3 и в PM7, как для альфа-спирали, так и для бета-листа кремниевый пептид продемонстрировал более выраженную термодинамическую стабильность, при этом глобальный экстремум теплоты образования такой кремниевой молекулы отвечает конформации бета-листа.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО ЯДРА ФОРМИРОВАНИЯ
АМИЛОИДНЫХ ПРОТОФИБРИЛ ИЗ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ ЗАВИСИМОСТИ СКОРОСТИ
ИХ ОБРАЗОВАНИИ И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЛАГ-ПЕРИОДА**

Determination of the size of the primary and secondary folding nuclei of amyloid protofibrils from the concentration dependence of the rate and the lag-time of their formation

***Финкельштейн А.В.1,2, Довидченко Н.В.1, Селиванова О.М.1, Суворина М.Ю.1,
Елисеева И.А.1, Сурин А.К.1,3, Шматченко В.В.1, Галзитская О.В.1***

1 – Институт белка РАН, г. Пущино, 142290, Московская обл.

2 – Пущинский филиал МГУ им. Ломоносова, г. Пущино, 142290, Московская обл.

3 – Государственный исследовательский центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск, 142279, Московская обл.

Тел./факс+7 (495) 514-02-18; эл. почта: afinkel@vega.protres.ru

Предложена модель кинетики формирования амилоидных протофибрилл, позволяющая рассчитать размер ядер их образования, используя только кинетические данные. Эта модель включает в себя этап первичной нуклеации, дальнейший линейный рост протофибрилл (за счет прикрепления мономеров к их концам) и возможный экспоненциальный рост протофибрилл путем либо роста с поверхности, либо фрагментации, либо образования вторичных ядер и ветвления фибрилл. Теоретически, только экспоненциальный рост совместим с существованием выраженного лаг-периода («задержки роста»), который может длиться гораздо дольше, чем последующий рост фибрилл. Полученное аналитическое решение позволяет определить размер первичных и вторичных ядер из экспериментально определенных концентрационных зависимостей для скорости роста и для соотношения длительности задержки роста к длительности последующего роста амилоидных протофибрилл. Теоретические результаты использованы для анализа экспериментальных данных, взятых из литературы и наших собственных – по образованию амилоида инсулином и его мутантом, LysPro инсулином.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-24-00157 и 14-14-00536

**Структура и динамика
нуклеиновых кислот и их комплексов**

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНИЦИАТОРНОГО БЕЛКА UL9 ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОДНОТЯЖЕВЫМИ И ДВУТЯЖЕВЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

Interaction of the initiator protein UL9 of herpes simplex virus type I with specific single-stranded and double-stranded oligonucleotides

***Бажулина Н.П.1, Моисеева Е.Д.1, Суровая А.Н.1, Гурский Я.Г.2, Андропова В.Л.3,
Никитин А.М.1, Галегов Г.А.3, Гроховский С.Л.1, Гурский Г.В.1***

1 – Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва,
ул. Вавилова, 32

2 – Кардиологический научно-производственный комплекс 121552 Москва, ул. 3-я Черепков-
ская, 15 а

3 – Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения, 123098 Москва,
ул. Гамалеи, 16

E-mail: bazh@eimb.ru

Мишенью для противовирусного действия димерных производных антибиотика нетропси-
на являются комплексы, образуемые хеликазой UL9 вируса простого герпеса с началом репли-
кации вирусной ДНК, включающим два сайта OriS и один сайт OriL. Согласно данным ДНКазно-
го футпринтинга бис-нетропсина избирательно связываются с А+Т-кластером в OriS. Они по-
вышают температуру плавления А+Т-кластера и ингибируют, вызванное тепловыми флуктуа-
циями раскрытие АТ-пар оснований, которое необходимо для инициации процесса раскручи-
вания ДНК хеликазой UL9. С помощью измерения эффективности резонансного переноса энер-
гии (FRET - метод) между флуоресцентными зондами, присоединенными ковалентно к 3'- и 5'-
концам олигонуклеотидов, соответствующих верхней и нижней нитям минимального дуплекса
OriS, исследована кинетика раскручивания ДНК хеликазой UL9. В качестве флуорофора и туши-
теля использовали 6-карбоксихородамин и краситель BHQ2 (Black hole quencher 2), радиус ми-
грации энергии равен 63 Å. Связывание димеров хеликазы с частичным дуплексом, содержа-
щим связывающие места I и III для хеликазы и АТ-богатый однотяжевый хвост, в отсутствие АТФ
приводит к образованию промежуточной структуры дуплекса, для которой расстояние между
флуорофором и тушителем уменьшается с 77 Å до 54 Å, что согласуется с образованием антипа-
раллельной структуры Холлидея. Значительное уменьшение расстояния между зондами на-
блюдалось также при связывании хеликазы с дуплексом, содержащим связывающие места I и
II и А+Т-кластер, при условии, что два димера хеликазы были присоединены к дуплексу, вызы-
вали его изгиб и частичное расплетение А+Т-кластера, что приводило к образованию структуры
Холлидея, включающей обратные повторы в связывающих местах I и II. Хеликаза UL9 узнает 4-х
нитевые модельные структуры Холлидея, образующиеся в растворе при отжиге неспецифиче-
ских синтетических олигонуклеотидов и связывается менее прочно с неспецифической двутя-
жевой и однотяжевой ДНК. Однотяжевые олигонуклеотиды (63 н), содержащие специфические
связывающие места I и II или I и III при взаимодействии с хеликазой образуют олигомеры, под-
вижность которых при электрофорезе в геле близка к подвижности комплексов хеликазы с мо-
дельной структурой Холлидея. Получены кривые плавления модельной структуры Холлидея,
специфических дуплексов и однотяжевых специфических олигонуклеотидов.

Pt-бис-нетропсин избирательно связывается с А+Т-кластером и ингибирует процесс рас-
кручивания минимального дуплекса OriS хеликазой UL9. Противовирусная активность бис-
нетропсинов связана с их способностью ингибировать хеликазную активность инициаторного
белка UL9 вируса герпеса.

*Работа поддержана Программой Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и грантом
РФФИ № 14-04-01269.*

УФ — СПЕКТРОСКОПИЯ КОМПЛЕКСОВ ДВУХВАЛЕНТНОЙ МЕДИ С НУКЛЕОТИДАМИ И НУКЛЕОТИДНЫМИ ПАРАМИ.**UV - Spectroscopy bivalent cupric complexes with nucleotides and nucleotide pairs**

Бачурин С.С.1,3, Корниенко И.В.2,3, Клецкий М.Е.3, Буров О.Н.3, Аскалепова О.И.3, Фалеева Т.Г.2,4

1 — ГБОУ ВПО Ростовский гос. мед. университет МЗ РФ, 344022, Нахичеванский, 29.

2 — Филиал №2 ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» МО РФ, 344000, Лермонтовская, 60

3 — Южный Федеральный Университет, 344006, ул. Большая Садовая, 105/42

4 — Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, Россия, 191015, ул. Кирочная, д. 41.

В последние годы возрос интерес к процессам комплексообразования тяжелых металлов с белками и нуклеиновыми кислотами организма человека. В частности ион двухвалентной меди, будучи хорошим комплексообразователем, представляет большой интерес для фармацевтики. Его производные с органическими лигандами широко изучаются в качестве кандидатов в противоопухолевые препараты. [1] С другой стороны ион меди сам по себе является довольно интересным биометаллом [2], способным вступать во взаимодействия с различными лекарственными препаратами *in vivo*, потенцируя их фармакологические эффекты или вызывая новые [3]. Эти эффекты обуславливаются способностью меди вступать в реакцию комплексообразования с белками и нуклеотидами ДНК и РНК. Однако характер данных взаимодействий не до конца ясен. В частности остаются вопросы о селективности ионов меди к комплиментарным парам азотистых оснований.

Для изучения возможной избирательности ионов меди (II) к нуклеотидам была использована УФ — спектроскопия. Этот метод часто применяется для изучения комплексообразования меди (II) с ДНК [1,3,4]. Определяли УФ спектры водных растворов дезоксирибонуклеотид трифосфатов (аденозина, тимидина, гуанидина, цитидина) заданной концентрации в диапазоне от 200 до 350 нм. Также определяли спектры растворов после добавления эквимольных количеств $MgCl_2$, $CuCl_2$ и при совместном добавлении обоих ионов.

При анализе данных спектроскопии было обнаружено, что ионы меди (II) увеличивают интенсивность оптического поглощения раствора сильнее при взаимодействии с дГТФ и дЦТФ. Характер изменения поглощения нелинеен. Такая же ситуация наблюдается при взаимодействии меди (II) с нуклеотидной парой дГТФ-дЦТФ. На характер поглощения водных растворов дАТФ, дТТФ и их комплексов медь не оказывает каких-либо нелинейных влияний. По крайней мере, они не были замечены в ходе экспериментов. Ионы магния практически не влияли на поглощение раствором УФ-излучения в диапазоне 200 — 350 нм, причём вне зависимости от порядка прибавления (до хлорида меди или после) к раствору нуклеотид дезоксирибонуклеотид-трифосфата (дНТФ).

Наблюдаемый батохромный эффект у комплексов дЦТФ — медь в области около 270 нм и интенсивные гиперхромные эффекты у комплексов дЦТФ — медь, дГТФ-медь, дЦТФ-дГТФ-медь в областях 200- 225 нм, позволяют нам высказать предположение об избирательности комплексообразования меди как с парами гуанин-цитозин в молекуле ДНК, так и с отдельными дезоксирибонуклеотидами и рибонуклеотидами в одноцепочечных полимерах. Такая избирательность указывает на возможное влияние ионов меди не только на молекулы ДНК, но и РНК, что может найти применение в фармацевтике.

1. Ganeshpandian, M., Loganathan, R., et al., Polyhedron, 2013, vol. 52, pp. 924-938.
2. Kato, M. and Muto, Y., Coord. Chem. Rev., 1988, vol. 92, pp. 45-83.
3. Dimiza, F., Perdih, F., et al., Journal of Inorganic Biochemistry, 2011, vol. 105, pp 476-489.
4. Chetana, P.R., Rao, R., et al., Polyhedron, 2014, vol. 68, pp. 172-179.

МАГНИТНАЯ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ КЛЕТОК SACCHAROMYCES CEREVISIAE МАРКИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Magnetic susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* cells marked with magnetic nanoparticles

Беспалова С.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В.

Донецкий национальный университет, 83055, г. Донецк, ул. Университетская, 24

e-mail: yu-legen@mail.ru

В последние годы актуальны исследования, связанные с приготовлением магнитоуправляемых адсорбентов, биокатализаторов и биосенсоров, которые имеют широкий спектр экологического и биотехнологического применения [1-3]. Эти объекты интересны тем, что ими можно манипулировать с помощью приложения внешнего магнитного поля. Для придания биологическим объектам магнитных свойств производят процедуру магнитомаркирования, суть которой заключается в связывании определенного магнитного материала на поверхности клетки или в цитоплазме. На данный момент считается, что наилучшим веществом для магнитомаркирования клеток являются магнитные наночастицы оксидов железа, обладающие суперпарамагнитными свойствами (СПИО) [1-3]. В настоящей работе в качестве объекта для магнитомаркирования использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как, во-первых, они уже давно закрепились в роли модельного объекта в биологических исследованиях и во-вторых, дрожжи являются эффективным адсорбентом тяжелых металлов, что делает возможным применение их в роли очистителя загрязненных вод. Поэтому создание магнитоуправляемых дрожжей может иметь огромный потенциал для практического применения. В работе исследовано влияние внеклеточной концентрации магнитомаркирующих частиц на магнитную восприимчивость χ маркированных дрожжевых клеток. Процедура синтеза СПИО производилась при совмещении двух методов, описанных в работах [4, 5]. Готовили 0.5 % масс раствор смеси солей FeCl_2 и FeCl_3 в мольном соотношении 1:2. После этого в раствор вносили 1 мл ТМАГ. Затем перемешивали раствор с помощью магнитной мешалки. В процессе перемешивания медленно по каплям добавляли водный раствор аммиака. После образования осадка надосадочная жидкость сливалась, а осадок трехкратно промывался дистиллированной водой. После этого в осадок магнетита дополнительно вносили 1 мл 25% ТМАГ. Дистиллированной водой доводили объём до 100 мл и перемешивали раствор. Полученный коллоидный раствор центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 минут с целью осадить крупные частицы. После центрифугирования надосадочную жидкость, содержащую наночастицы магнетита, сливали в отдельную колбу. Полученные наночастицы использовали для дальнейшего магнитомаркирования дрожжевых клеток. Процедуру магнитомаркирования дрожжей производили по аналогии с методикой, описанной в работе [3]. В настоящей работе проведена магнитная модификация дрожжевых клеток с помощью наночастиц оксида железа при изменении концентрации внеклеточного железа C_{Fe} . С помощью измерения магнитофоретической скорости движения таких клеток в высокоградиентном магнитном поле с силовым фактором порядка $10 \text{ T}^2/\text{м}$ определена магнитная восприимчивость χ магнитомаркированных дрожжевых клеток. Установлено, что, при увеличении C_{Fe} в диапазоне от 1.2 до 6 мМ, χ изменяется в диапазоне от $6 \cdot 10^{-5}$ до $3 \cdot 10^{-4}$. Показано, что с увеличением C_{Fe} в исследованном диапазоне, скорость движения в градиентном поле и магнитная восприимчивость маркированных клеток возрастает линейно. Проведен анализ жизнеспособности магнитных клеток путём их посева на твёрдой питательной среде.

1. Pospiskova, K. and Prochazkova, G., Letters in Applied Microbiology, 2013, no. 56, pp. 456-461.
2. Naumenko, E.A. and Dзамукова, M.R., Implantable Bioelectronics, 2014, pp. 7-26.
3. Safarikova, M. and Maderova, Z., Food Research International, 2009, no. 42, pp. 521-524.
4. Петракова, А.В., Урусов, А.Е., и Костенко, С.Н, Современные проблемы науки и образования, 2013, №5, сс. 675-682.
5. Adelman, N.B., Journal of Chemical Education, 1999, vol. 76, no. 7, pp. 943-948.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ХРАНЕНИЯ И УСЛОВИЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА**Influence of temperature and cryopreservation conditions on the human sperm DNA fragmentation**

Гармаева С.Б.1, Миронова А.Г.2, Симоненко Е.Ю.1, Яковенко С.А.1, Григорьева А.А.1, Твердислов В.А.1, Апрышко В.П.2

1 – Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – Клиника АльтраВита, 117186, Москва, ул. Нагорная, д. 4А

Тел.: +7(495)939-30-25; e-mail: sb.garmaeva@physics.msu.ru; ksimonenko@inbox.ru

Введение и актуальность. Дефекты мужского генома, характеризующиеся фрагментацией ДНК, могут служить показателем мужской субфертильности независимо от рутинных параметров спермы [1]. Сперматозоиды даже со значительным уровнем повреждений ДНК сохраняют способность оплодотворить ооцит, однако эмбриональное развитие может блокироваться на разных этапах. В клиниках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) сперматозоиды инкубируют при физиологической температуре (37⁰С) в течение 1-2 часов перед процедурами ЭКО и ИКСИ, а также подвергают криоконсервации, что, согласно последним исследованиям, может значительно влиять на уровень фрагментации ДНК сперматозоида [2]. Таким образом, целью данной работы является исследование методом TUNEL влияния различных температурных режимов, в том числе, криоконсервации на степень фрагментации ДНК в сперматозоидах (%СДФ). **Материалы и методы.** В работе исследовались образцы спермы 19 доноров и пациентов с установленной нормозооспермией (ВОЗ). Целостность ядерной ДНК оценивалась методом TUNEL (метод прямого мечения разрывов в ДНК - флуоресцеин-12-dUTP и Hoechst 33258). Подсчет проводился на 500 клеток. Криоконсервация по стандартному протоколу медленной заморозки; криопротектор SpermFreeze (Sage); быстрая разморозка при 37⁰С. **Результаты.** Проведены следующие серии экспериментов: при температурах +21⁰С; +39⁰С через интервалы времени 0/8/24 ч, для T=37⁰С временной интервал составлял 0/0.5/2.5/5/8/24 ч. Средняя фрагментация в нативном образце доноров составляла 8,1±2,6%. Значительное увеличение %СДФ наблюдалось для всех температур с течением времени. Через 24 ч инкубации при T=39⁰С фрагментация составила 100%, причем через 8 ч %СДФ увеличился на 76,7% ± 7,9%. Инкубация при T=21⁰С в течении 24 ч увеличила %СДФ только в 2,2±0,29 раза. Инкубация при T=37⁰С показала, что основное количество ДНК фрагментированных сперматозоидов возникает в первые восемь часов инкубации (зависимость %СДФ от времени для T=37⁰С имеет нелинейный характер). В образцах, замороженных без добавления криопротектанта, %СДФ увеличился в 1,9±0,4 раз, в то время как образцы с добавлением криопротектанта после криоконсервации практически не отличались от нативных образцов (в пределах ошибки). Однако после инкубации в течение 24 часов при T=21⁰С %СДФ в нативных образцах и образцах без криопротектора, увеличился в 2 раза, а в образцах, содержащих криопротектор, %СДФ увеличился более чем в 3 раза (3,1±0,32). Криопротектор SpermFreeze является проникающим и, согласно данным эксперимента, проявляет цитотоксичность после разморозки, что увеличивает риск отбора сперматозоида с поврежденным генетическим материалом для ЭКО и может привести к неправильному развитию эмбриона. Таким образом, температурный режим может оказывать непосредственное влияние на исход ЭКО и ИКСИ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-50-0029).

1. Erenpreiss, J. and Spano, M., Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects, Asian J. Androl., 2006, vol. 8, no. 1, pp. 11-29.
2. Dalzell, L.H., McVicar, C.M., McClure, N., Lutton, D., and Lewis, S.E., Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm, Fertil. Steril., 2004, vol. 82, pp. 1443-5.

СПЕЦИФИЧНЫЕ ДНК-БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТИПОВ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ АГЕНТОВ

Specific protein - DNA complexes as targets for design of new types of antiviral drugs

Гурский Г.В.1., Моисеева Е.Д.1, Бажулина Н.П.1, Суровая А.Н.1, Андропова В.Л.2, Никитин А.М.1, Гурский Я.Г.3, Гроховский С.Л.1, Галегов Г.А.2

1 – Институт молекулярной биол. им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва ул. Вавилова, 32

2 – Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16

3 – Кардиологический научно-производственный комплекс, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15 а

E-mail: gursky@eimb.ru

В ходе настоящей работы были синтезированы ДНК-связывающие соединения, которые селективно подавляют развитие вирусного цитопатического эффекта в культуре клеток Vero E6, инфицированных вирусом простого герпеса первого типа. Данные ДНКазного футпринтинга показывают, что эти соединения связываются с А+Т кластером в начале репликации вируса OriS и защищают А+Т кластер от расщепления ДНКазой I. Мы исследовали связывание с ДНК этих соединений с помощью UV и КД спектроскопии, флуоресцентных методов и подвижности комплексов при электрофорезе в геле. В отличие от ацикловира, который является ингибитором вирусной ДНК полимеразы, димерные производные нетропсина ингибируют процесс локального раскручивания ДНК, катализируемый хеликазой UL9 вируса, т.е. действуют на ранней стадии жизненного цикла вируса, когда синтез вирусной ДНК еще не имел места. Резонансный перенос энергии возбуждения по механизму Ферстера (FRET) был использован в качестве метода для исследования структурных изменений, индуцируемых при связывании хеликазы UL9 дуплексом OriS, а также для исследования кинетики хеликазной реакции. В экспериментах использованы олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентные метки, присоединенные к 5'- и 3'-концам олигонуклеотидов в минимальном дуплексе OriS. Показано, что Pt-бис-нетропсин и другие бис-нетропсины уменьшают скорость раскручивания минимального дуплекса OriS хеликазой. Антивирусная активность этих соединений связана с их способностью ингибировать флуктуационное открытие пар оснований в А+Т кластере в OriS. Показано, что хеликаза UL9 индуцирует образование 4-х нитевой структуры Холлидея при взаимодействии с дуплексами, входящими в состав фрагмента OriS ДНК вируса герпеса. Хеликаза также узнает 4-х нитевые структуры Холлидея, образующиеся в растворе при отжиге неспецифических олигонуклеотидов, и связывается менее прочно с двутяжевой и одנותяжевой ДНК. Белок образует три типа комплекса с модельной структурой Холлидея. Комплексы 1 и 2 соответствуют связыванию двух и четырех димеров белка на олигомер ДНК и обнаруживают сходство со связыванием одного и двух тетрамеров белка RuvA *E. coli* со структурой Холлидея в "открытой" форме. Этот конформер присутствует в растворе в отсутствие ионов Mg^{2+} . Он обнаружен также в комплексах с белками, способными узнавать структуру Холлидея в "открытой" конформации. Что касается третьего типа комплекса хеликазы UL9, то он образуется в присутствии ионов Mg^{2+} и, вероятно, соответствует связыванию хеликазы со структурой Холлидея в компактной "стэкинг" X-форме. Мы обнаружили, что если один из двуспиральных участков в структуре Холлидея содержит протяженный одנותяжевый "хвост" на 3'-конце, то хеликаза UL9 катализирует процессинг структуры Холлидея, который усиливается в присутствии 5 мМ АТФ. Аналогичный подход был нами использован для создания эффективных ингибиторов, подавляющих инициацию синтеза плюс-нити ДНК вируса иммунодефицита человека.

ТЕОРИЯ ИНТЕРЦЕПТОРНО-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИЙ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ**The theory of interceptor-protector action of combinations of DNA-binding drugs**

Евстигнеев М.П.1,2, Евстигнеев В.П.1, Бучельников А.С.2, Рубакина В.А.1

1 – ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, ул. Университетская, 33, г.Севастополь, 299053

2 – Белгородский государственный исследовательский университет, пр. Победы, 85, г. Белгород, 308015

e-mail: max_evstigneev@mail.ru

В настоящей работе рассматриваются основы теории интерцепторно-протекторного действия при совместном использовании различных комбинаций ДНК-связывающихся ароматических биологически активных соединений [1-3]. В основу данной теории положено представление о существовании двух фундаментальных механизмов регуляции биологической активности ароматического лиганда X в присутствии другого ароматического соединения Y : интерцепторный механизм, обусловленный комплексообразованием X - Y (гетероассоциация), и протекторный механизм, обусловленный комплексообразованием лиганда Y с ДНК (конкурентное связывание). Оба механизма приводят к уменьшению доли лиганда X , связанного с ДНК, и, как следствие, изменению его биологической активности. В рамках этих допущений формулируются два критерия – R_D и A_D – позволяющих дать количественную оценку соотношения эффективности интерцепторного и протекторного механизмов (R_D), и доли лиганда X , вытесненного из ДНК при добавлении лиганда Y (A_D). Показано, что при соответствующей параметризации основных уравнений динамического равновесия в трехкомпонентной смеси X - Y -ДНК, фактор A_D может выступать мерой изменения биологического эффекта X при добавлении Y *in vitro*. На основании опубликованных данных клеточного эксперимента по детоксицирующему действию различных ароматических молекул-интерцепторов (кофеин, рибофлавин, фуллерен C_{60}) по отношению к типичным ДНК-связывающимся препаратам (некоторые противоопухолевые антибиотики и мутагены), показано соответствие результатов биологического эксперимента и теоретического расчета. Теория интерцепторно-протекторного действия является первой демонстрацией возможности количественного описания биологического эксперимента на основании данных независимого физико-химического эксперимента для класса ароматических ДНК-связывающихся лигандов.

1. Buchelnikov, A.S., Hernandez Santiago, A.A., et al., Eur. Biophys. J., 2012, vol. 41, pp. 273-283.
2. Skamrova, G.B., Laponogov I., et al., Eur. Biophys. J., 2014, vol. 43, pp. 265-276.
3. Buchelnikov, A.S. and Evstigneev, M.P., J. Theor. Biol., 2014, vol. 357, pp. 268-271.

ХИРАЛЬНОСТЬ КАК ОСНОВА СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДНК

Chirality as the foundation of DNA structural organization

Жулябина О.А., Твердислов В.А.

МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.2

e-mail: zhulyabina.o@yandex.ru;tverdislov@mail.ru

В работе рассмотрены подходы к описанию биомеханики ДНК, связи ее термодинамических параметров со структурной хиральной иерархией и механическими свойствами с учетом поступательных и вращательных степеней свободы. Разрабатывается модель, отражающая поведение структур со знакопеременной хиральной иерархией, в частности, ДНК и белков.

В основе строения любых систем – живых и неживых – лежит ряд базовых принципов. Ранее была сформулирована гипотеза, в соответствии с которой происходит процесс формирования и развития хиральных систем: внутри одного иерархического уровня эволюционирующая система имеет элементы одного знака хиральности; система может неоднократно изменять тип симметрии внутри этого уровня, при этом повышая сложность, а при переходе на более высокий иерархический уровень происходит смена знака хиральности. Благодаря особому строению атома углерода (асимметричность), лежащего в основе большинства биомолекул и способного образовывать хиральные соединения, все молекулярно-биологические системы развиваются через череду бифуркаций. Это можно показать на примере структурно-функциональной организации белковых структур и ДНК. Дезоксирибоза, составляющая базовый полимер, является D-изомером. Мономерами ДНК являются нуклеотиды, представленные в основном в L-конформации. Двойная спираль ДНК – правая. Во время сверхспирализации образуется левая суперспираль. Как, например, у бактерий. Таким образом, мы можем наблюдать чередование знака хиральности при рассмотрении структурного устройства ДНК: D-L-D-L. Аналогичная схема прослеживается и у белков: аминокислоты – «левые», альфа-спирали – правые и т.д. Такая особенность этих биомакромолекул создает возможность образования в них выделенных механических степеней свободы, которые становятся основой их функционирования как молекулярных биологических машин, преобразующих энергию, вещество и информацию. Таким образом, нелинейная система имеет тенденцию к спонтанному формированию последовательности иерархических уровней с изменяющимся знаком хиральности заново образующихся структур и с увеличением их относительного масштаба при прохождении через череду бифуркаций [1,2].

На данный момент выполнена количественная оценка механических параметров для нити двойной спирали ДНК при переходе из B-формы в A-форму на основании модели Эйлера об устойчивости винтовых пружин. Полученные расчетные данные соответствуют экспериментальным, имеющимся в литературе.

Рассматриваемая в данной работе проблема представляется актуальной, так как её развитие поможет понять важнейший физический аспект молекулярной биологии, касающийся фолдинга, связи структуры и функции биомакромолекул, а также эволюционные принципы развития сложных систем с хиральной иерархичностью.

1. Tverdislov, V.A., Chirality as a primary switch of hierarchical levels in molecular biological systems, Biophysics, 2013, т. 58, №1, сс. 128-132.
2. Жулябина, О.А., Малышко, Е.В., Ильченко, С.А., и Твердислов, В.А., Вестник науки и образования, 2015, т. 4, №6, сс. 24-25.

РОЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АКТИНОПОРИНОВ HETERACTIS CRISPA**The role of electrostatic interactions in conformational changes of N-terminal fragment of actinoporins *Heteractis crispa*****Зелепуга Е.А., Монастырская М.М., Лейченко Е.В., Козловская Э.П.**

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, проспект 100-летия Владивосток, 159

Тел.: +7(423)231-61-56; факс: +7(423) 231-40-50; e-mail: zel@piboc.dvo.ru

Пороформирующие токсины актиний, актинопорины, представляют огромный интерес как инструменты исследования механизмов функционирования цитоплазматических мембран. Эти уникальные водорастворимые полипептиды способны претерпевать конформационную реорганизацию при взаимодействии с липидным бислоем с последующей олигомеризацией четырех или девяти молекул и образованием поры их N-концевыми фрагментами. Тонкий механизм конформационных перестроек молекулы полипептида до конца не установлен. Ранее мы показали, что актинопорины *Heteractis crispa* кодируются мультигенным семейством и образуют комбинаторную библиотеку актинии. Аминокислотные последовательности представителей семейства отличаются небольшим количеством замен, однако наиболее вариабельным участком молекулы является N-концевой фрагмент (1-28 а.о.). С особенностями его структуры принято связывать проявление актинопоринами цитолитической активности, поскольку данный фрагмент непосредственно участвует в процессе образования поры и, в отличие от основного β -кора молекулы, претерпевает при этом значительную конформационную реорганизацию. Проведенный расчетными методами детальный анализ внутримолекулярных взаимодействий N-концевого фрагмента показал, что он достаточно тесно связан с β -кором посредством обширной сети гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также водородных связей. Согласно результатам молекулярного моделирования и сравнительного анализа распределения электростатических свойств на поверхности представителей мультигенного семейства *H. crispa*, длина, и, соответственно, энергия ионной связи между боковыми цепями двух высоко консервативных остатков, C-концевого Glu168 и Lys28, локализованного на «псевдожесткой» петле SRK (30-32 а.о.), соединяющей N-конец с β -кором, может варьировать в зависимости от присутствия/отсутствия остатков Asp или Glu в положении 20. Отрицательный заряд в данном положении вызывает неблагоприятные электростатические взаимодействия с одноименно заряженной боковой цепью остатка Glu168. В свою очередь это приводит как к увеличению длины ионной связи Glu168 с Lys28 (с $2,39 \pm 0,5$ до $4,32 \pm 0,7$ Å) по сравнению с другими представителями библиотеки, имеющими нейтральный гидрофильный остаток Asn20, так и к снижению плотности положительного заряда в области молекулярной поверхности, ответственной за распознавание мембраны актинопоринами. Последнее выражается в значительном изменении величины и направления дипольного момента N-концевого фрагмента молекулы, что способствует ослаблению прочности связывания данного фрагмента с β -кором и, как следствие, облегчает его диссоциацию и переход в водно-липидный интерфейс при взаимодействии актинопорина с отрицательно заряженной поверхностью мембраны. В конечном итоге это влияет на скорость изменения конформации молекулы и ассоциации N-концевого фрагмента с мембраной при формировании поры. Эти результаты согласуются с данными по гемолитической активности актинопоринов семейства *H. crispa*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-25-00037.

О ПРИРОДЕ ДОМИНИРОВАНИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ (dA:dT) ТРЕКОВ В СТРУКТУРЕ ГЕНОМОВ ЭУКАРИОТ.

On the nature of oligo(dA:dT) tracks domination in the eukaryotes genome structure

Комаров В.М. 1, Самченко А.А. 1, Кабанов А.В. 1, Кондратьев М.С. 1, Киселев С.С. 1, Лосев А.А. 2

1 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино, Институтская ул. д. 3;

2 – Волгоградский госуниверситет, 400062, г. Волгоград, пр-т Университетский д. 100

Тел.: +7(4967)73-06-81; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: komarov@icb.psn.ru

Считается, что одним из ключевых параметров структурно-функциональной организации молекул нуклеиновых кислот является содержание GC-пар. Хотя у разных организмов содержание гуанин-цитозиновых пар может заметно отличаться, тем не менее, в кодирующих последовательностях его процентный вклад всегда наблюдается повышенным по отношению к другим областям генома. С другой стороны, все больше появляется данных, указывающих на нетривиальный характер вкладов коротких олигонуклеотидных последовательностей как моно-, так и смешанной природы (так называемых W- и S-треков с A/T и G/C составом, соответственно) в организацию структуры генома. Более того, для случая, в частности, геномов простейших микроорганизмов выявляется неожиданное преимущество вкладов A/T-треков по отношению к G/C-последовательностям. Поскольку функции большинства из повторяющихся и уникальных последовательностей до сих пор не определены представляется чрезвычайно актуальным проведение в первую очередь полного сравнительного анализа частот встречаемости олигонуклеотидных двойных цепочек из AT- или GC-пар в геномах различных видов организмов.

В данной работе с целью выявления особенностей строения геномной ДНК проведено сравнение частот появления олигомерных мономерных и смешанных W- и S- нуклеотидных треков в геномах 7 разных организмов эукариот с последовательно увеличивающимся процентным GC составом: *Dictyostelium discoedum* (25.7%); *Caenorhabditis elegans* (36.9%); *Arabidopsis thaliana* (38%); *D.melanogaster* (38.8%); *H.sapiens* (40.0%); *G.gallus* (50.0%), *Leishmania major* (59.1%). Исследованы частоты появления треков длиной n от 1 до ∞ . Впервые показано, что во всех рассмотренных случаях геномов эукариот частота встречаемости олигонуклеотидных моно и смешанных W (dA:dT) треков с увеличением размеров трека всегда оказывалась доминирующей над встречаемостью S (dG:dC) треков. Причем, если в асимптотике W-треков можно было встретить появление повторов длиной порядка нескольких сотен пар нуклеотидов, то в случае S-треков частота встречаемости длинных повторов практически сходила к нулю, как правило, уже в районе длин до двух десятков пар нуклеотидов! И это было характерно как для GC-дефицитных, так и для GC-богатых геномов эукариот. Обнаруженное разительное отличие во встречаемости AT и GC нуклеотидных повторов в составе геномов эукариот указывает на возможное существование каких-то внутренних нетривиальных фундаментальных отличий в структурной организации AT- и GC-пар, которые могут приводить к таким масштабным эффектам «накопления». В работе, на основе использования квантово-химических расчетов, развивается идея о возможно важной роли в данном процессе скрытого структурного полиморфизма геометрии уотсон-криковских GC- и AT-пар. Бистабильный характер пирамидального строения валентных связей аминокрупп азотистых оснований формирует четырехкратный структурный полиморфизм GC-пары и 2 кратный – AT-пары. Вполне вероятно, что по причине своей повышенной неоднозначности геометрии комплементарного H-связывания «использование» GC-пары, как менее «предсказуемого» элемента в регулярном воспроизведении исходной геометрии уотсон-криковского спаривания оснований, было попросту минимизировано природой для обеспечения надежности протекания генетических процессов редупликации, транскрипции, а также возможно и других процессов.

ТЕРМОДИНАМИКА РИБОСОМЫ В ПРОЦЕССЕ ТРАНСЛОКАЦИИ**Thermodynamics of the translocating ribosome****Коневега А.Л.1,2**

1 – НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики, 188300, Гатчина, Орлова роща

2 – Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Тел.: + 7(813)714-67-84; факс: +7(81371)323-03; e-mail: akonevega@omrb.pnpi.spb.ru

В процессе биосинтеза белка каждый раунд удлинения полипептидной цепи на рибосоме завершается реакцией транслокации, синхронным передвижением матричной РНК (мРНК) на один кодон одновременно с перемещением деацилированной тРНК из Р в Е сайт, и пептидил-тРНК из А в Р сайт. В бактериальной белоксинтезирующей системе транслокация катализируется элонгационным фактором EF-G и сопровождается гидролизом GTP, обеспечивая высокую скорость биосинтеза белка. Ранее было показано, что в отсутствие EF-G и GTP для некоторых тРНК транслокация может проходить в обратном направлении [1]. При этом направление транслокации зависит от термодинамического градиента, определяемого различными аффинностями тРНК к А, Р и Е сайтам рибосомного комплекса. Исследования спонтанной обратной транслокации биохимическими и структурными методами показали сопряженность перемещений тРНК в межсубъединичном пространстве с конформационными изменениями рибосомы [2]. Использование некорректно аминокислотированных пептидил-тРНК в пре- и пост-транслокационных рибосомных комплексах позволило продемонстрировать, что именно тРНК, а не аминокислота, определяет специфическую способность отдельных пептидил-тРНК к эффективной обратной транслокации. После пептидилтрансферазной реакции аффинности пептидил-тРНК и деац тРНК к А и Р сайтам уменьшаются, изменяя термодинамический профиль рибосомного комплекса перед последующей реакцией транслокации. Связывание элонгационного фактора EF-G·GTP с рибосомой приводит к универсальной быстрой прямой реакции транслокации вне зависимости от свойств конкретных тРНК в рибосомном комплексе.

Работа поддержана грантом РФ 14-34-00023

1. Konevega, A.L., Fischer, N., Semenov, Y.P., Stark, H., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V., Spontaneous reverse movement of tRNA-mRNA through the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007, vol. 14, p. 318.
2. Fischer, N., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Stark, H., Ribosome dynamics and tRNA movement as visualized by time-resolved electron cryomicroscopy, *Nature*, 2010, vol. 466, p. 329.
3. Semenov, Y.P., Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W., *Nat. Struct. Biol.*, 2000, vol. 7, p. 1027.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ ПЕТЛИ $\beta 2$ - $\beta 3$ БЕЛКА L5 НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РИБОСОМЫ *ESCHERICHIA COLI* IN VIVO

Коробейникова А.В., Максимова Е.М., Корепанов А.П., Гарбер М.Б., Гонгадзе Г.М.

ФГБУН Институт белка РАН, 142290, Пущино, Московская обл., ул. Институтская, 4

факс: (495)514-0218; e-mail: kav-20@rambler.ru

Эволюционно консервативный 5S рРНК-связывающий белок L5 расположен на вершине центрального протуберанца большой рибосомной субчастицы и согласно кристаллографическим данным может образовывать функционально важные контакты в рибосоме. Ряд петель, составляющих половину структуры этого белка, участвуют во взаимодействии с рибосомными компонентами и лигандами трансляции. Так, петля $\beta 2$ - $\beta 3$ белка L5 простирается до тРНК в Р-участке бактериальной рибосомы. При этом некоторые консервативные аминокислотные остатки белка L5 (S73 и R80 в белке *Escherichia coli*) могут формировать водородные связи с нуклеотидами (G19 и C56) D и T петель тРНК. На основании этих и других данных была предложена возможная модель участия белка L5 в транслокации тРНК в рибосоме, однако детали этого процесса до сих пор остаются неясны.

Мы решили проверить, как отразятся изменения в петле $\beta 2$ - $\beta 3$ (71-RKSVAGFKIRQG-82) белка L5 на активности аппарата трансляции *E. coli* in vivo. Для этого был создан ряд штаммов *E. coli*, в которых белок L5 был заменен на одну из мутантных форм: с точечными заменами в области контакта с тРНК (S73A и/или R80A) или делецией нескольких остатков в петле ($\Delta A75$ -K78 или $\Delta S73$ -R80). Оказалось, что одиночная замена S73A или R80A, так же как и замена двух этих остатков не влияет на рост клеток и активность их аппарата трансляции. Однако удаление восьми или только четырех остатков в петле $\beta 2$ - $\beta 3$ приводит к замедлению роста клеток (в 2 и 1.5 раза, соответственно) и снижению активности их аппарата трансляции. Таким образом, исключение прямого контакта белка L5 с тРНК не влияет на функционирование бактериальной рибосомы in vivo, однако присутствие в белке торцевой части петли $\beta 2$ - $\beta 3$ оказывается для этого очень важным. В этом участке петли есть эволюционно консервативный F77, который, исходя из структурных данных, может образовывать стэкинг-взаимодействие с консервативным A2311 23S рРНК. Мы проверили влияние изменений в этом участке ($\Delta F77$ или F77A) белка L5 на рост клеток и активность аппарата трансляции клеток. Оказалось, что такие точечные изменения в белке L5 приводят к замедлению роста клеток и снижению активности их аппарата трансляции, сравнимому с эффектом делеции четырех остатков ($\Delta A75$ -K78) в петле $\beta 2$ - $\beta 3$ белка L5. Используя метод химического пробинга РНК, мы исследовали влияние двух мутаций в белке ($\Delta F77$ или $\Delta A75$ -K78) на конформацию некоторых участков 23S рРНК. Оказалось, что в рибосомах, собранных в клетках обоих мутантных штаммов, изменяется доступность модифицирующим агентам соседних с A2311 нуклеотидов G2307 и G2308, расположенных в той же торцевой петле шпильки 84. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что консервативный F77 петли $\beta 2$ - $\beta 3$ белка L5 вовлечен в функционально важное взаимодействие с консервативным A2311 23S рРНК. Отсутствие данного контакта приводит к конформационным перестройкам в 23S рРНК, что, по-видимому, отражается на эффективности биосинтеза белка.

Работа поддержана грантом РФФИ (13-04-00587-а) и Программой МКБ РАН.

ЯДЕРНЫЕ ПОРЫ И “ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАБРИКИ” - ДВЕ СТАДИИ ОДНОГО ПРОЦЕССА**The nuclear pores and transcription factories are two stages of one process****Кувичкин В.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, г. Пущино, 142290, Московской обл., Институтская ул., дом 3

Тел. +74967739271, Факс+7 4967330509, E-mail: vvkuvichkin@gmail.com

Тройные комплексы (ТК): ДНК-фосфатидилхолин (ФХ) липосом двухвалентные катионы металлов, в отличие от липоплексов только в последнее время получили внимание [1]. Ранее мы предложили участие ТК в сборке ядерных пор. Образование ТК сопровождается агрегацией и слиянием ФХ липосом, что было показано методом замораживания-скальвания и сгу-ТЕМ [2]. Мембранные везикулы (~ 70 нм в диаметре), образующие ядерные поры являются аналогом ФХ - липосом в клетке. В нашей последней модели ядерных пор ТК возникают при взаимодействии двух мембранных везикул с участками хроматина, находящихся в форме трехцепочечных гибридов: ДНК - низкомолекулярные РНК (нмРНК). Температурная стабильность тройной спирали ДНК / нмРНК значительно ниже, чем двухцепочечной ДНК с той же последовательностью оснований. Трехспиральный гибрид раплетается во время слияния двух мембранных везикул, что приводит к образованию “пре - пор”: гибрида двухцепочечной ДНК / нмРНК и одноцепочечной ДНК (оцДНК), расположенных на наружном диаметре слившейся “большой везикулы”. Эта везикула в процессе взаимодействия с двумя бислоями ядерной мембраной по нашему мнению образует канал между мембранами. Во время этого слияния оцДНК и гибридной ДНК / нмРНК смещаются центр аннулы порового комплекса [3]. ОцДНК в аннule поры является причиной повышенной транскрипционной активности генов прилежащих к ядерной поре. Количество пор в ядре определяет территорию хромосом и количество петель хромосом. Не все “пре – поры” в процессе деконденсации хроматина достигают ядерной оболочки и становятся порами. Некоторым это удается сделать во время деконденсации хромосом в интерфазе, чем определяется вторая волна роста числа пор в ядерной оболочке. Остальные “пре – поры”, оставшиеся в центре ядра, формируют агрегаты и, поскольку в них также присутствует оцДНК, они могут конкурировать с порами по транскрипционной активности. По мнению автора нмРНК (U1-, U2- типов), вызывающие прикрепление хроматина к ядерной оболочке, влияют как на экспрессию генов, так и на дифференциацию клеток. В быстро делящихся эмбриональных клетках наблюдается наибольшее число активных генов, а ядро содержит максимальное количество пор. Во время дифференцировки количество активных генов и пор в ядре уменьшается. Передача нмРНК между клетками дает сведения об активно работающих генах, что способствует выживанию клеток, но может приводить к их раковому перерождению. ОцДНК расположенная вдоль наружного диаметра «больших везикул» служит местом инициации транскрипции. Т.о. агрегаты “пре - пор” можно рассматривать как транскрипционные фабрики. Агрегаты “пре - пор” из разных хромосом могут быть ответственны за эффект “целующихся хромосом”.

1. Kuvichkin, V.V., Bioelectrochemistry, 2002, vol. 58, pp. 3-12.

2. Kuvichkin, V.V., Danev, R., Shigematsu, H., and Nagayama, K. J., Membr. Biol., 2009, vol. 227, pp. 95-103.

3. Kuvichkin, V.V., J. Membr. Biol., 2011, vol. 241, pp. 109-116.

О ТОПОЛОГИИ НИТЕЙ ДНК (ГИПОТЕЗА)

On the topology of DNA strands (the hypothesis).

Кулинич А.В.

Московское общество испытателей природы, Адрес: 125009, г. Москва, ул. Большая Никитская, д. 6, МОИП
тел. 629-48-36; 629-39-84; e-mail: moip1805@yandex.ru, gishar@mail.ru

В 1953 году, Дж. Уотсон и Ф. Крик, используя данные М. Уилкинса, Р. Франклин и Э. Чаргаффа опубликовали модель двухцепочной ДНК, у которой нити комплементарны друг другу и закручены в спираль по всей длине. Модель логично и просто иллюстрировала механизмы наследственности живой клетки, но не объясняла главного, как у такой молекулы нити могут расходиться при репликации, если они переплетены на протяжении всей длины между собой.

Реплицироваться и транскрибироваться такая ДНК могла только в случае допущения существования в клетке некоего молекулярного механизма, способного расплести тончайшие нити ДНК, вращая их в вязкой среде. Чтобы обойти данное затруднение был предложен механизм, при помощи которого молекулы ДНК при репликации и транскрипции сначала разрезаются на небольшие фрагменты и затем вновь собираются с необходимой скоростью. Но тогда, как происходит расхождение и соединение нитей ДНК в процессе денатурации и ренатурации. Выход, по нашему мнению, может быть найден, если обратиться к науке механике, в которой имеется целый раздел о пружинах. Нам более всего интересен раздел о пружинах кручения, которые ещё называются торсионными.

Торсионные пружины возникают при кручении, деформации тела подвергающегося нагрузке в виде пары сил в поперечной плоскости. Торсионные пружины могут быть как право, так и лево закрученные.

Кроме того, в разделе торсионных пружин имеются ещё целый класс трубчатых манометрических пружин или пружин Бурдона.

Трубчатые пружины деформируются под влиянием изменения внутреннего давления в поперечном сечении. Аналогия с ДНК становится очевидной, если представить её существование в жидкой среде в виде трубчатой тонкостенной пружины с гидратной оболочкой или трубчатого полииона с противоионным окружением.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ТРАНСЛЯЦИИ АНТИБИОТИКОМ АМИКУМАЦИНОМ А**Study of the molecular mechanism of translation inhibition by the antibiotic amicoumacin A**

Максимова Е.М.1,2, Полесскова Е.В.1, Касацкий П.С.1,2, Махно В.И.1, Остерман И.А.3, Роднина М.В.4, Донцова О.А.3, Сергеев П.В.3, Коневега А.Л.1,2

1 – НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики, 188300, Гатчина, Орлова роща

2 – Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

3 – НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ, 119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 40

4 – Институт биофизической химии общества Макса Планка, 37077, Германия, Геттинген
Тел.: + 7(813)714-67-84; факс: +7(81371)323-03; e-mail: akonevega@omrb.pnpi.spb.ru

Амикумацин А (АМІ) относится к группе изокумарин производных антибиотиков. Ранее было показано, что антибактериальное действие амикумацина направлено на подавление белкового синтеза клетки. Кристаллическая структура комплекса бактериальной рибосомы с амикумацином выявила необычный сайт связывания антибиотика на рибосоме [1]. Так, в отличие от многих антибиотиков, подавляющих трансляцию полипептида либо за счет изменения структуры функциональных центров рибосомы, либо за счет ингибирования действия функциональных лигандов рибосомы, амикумацин А связывается в Е сайте 30S субчастицы. Антибиотик образует контакты с нуклеотидами спирали h24 16S рРНК и нуклеотидами мРНК в районе стартового AUG кодона, однако никаких контактов между амикумацином и тРНК в Е сайте выявлено не было. Кроме того, было показано, что некоторые мутации в IV домене элонгационного фактора EF-G, катализирующего транслокацию, компенсируют ингибирующее действие этого антибиотика [1]. Однако молекулярный механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином до сих пор неизвестен. При изучении ингибирования функциональной активности рибосомы в *in vitro* системе с использованием матрицы poly(UUC), синтез полипептида (Phe)_n замедляется в присутствии амикумацина. Использование быстрой пурамициновой реакции позволило выявить, что антибиотик понижает эффективность транслокации пептидил-тРНК из А в Р сайт рибосомы. Для более детального изучения механизма ингибирования была изучена престаационарная кинетика реакции транслокации с помощью метода остановленного потока. Были использованы три флуоресцентномеченых лиганда: мРНК, пептидил-тРНК в А сайте и деацилированная тРНК в Е сайте. Показано, что амикумацин не влияет на скорости перемещения пептидил-тРНК из А в Р сайт и продвижения мРНК в рибосоме, но, по-видимому, оказывает влияние на конформационные изменения рибосомы на поздних этапах реакции транслокации. В то же время, антибиотик способствует стабилизации деацилированной тРНК в Е сайте рибосомы, которая в норме свободно диссоциирует из Е сайта после перемещения комплекса мРНК и тРНК молекул. Таким образом, наиболее вероятный механизм ингибирования трансляции бактериальной рибосомы амикумацином А связан с увеличением аффинности тРНК к Е сайту рибосомы, что приводит к замедлению каждого раунда элонгации при синтезе полипептидной цепи.

Работа выполнена при поддержке РФФИ комфи 13-04-40212 и 13-04-40211.

1. Polikanov, Y.S., Osterman, I.A., et al., Mol. Cell, 2014, т. 56, сс. 531-540.

ТРАНСРЕНАЛЬНАЯ ДНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ НАГРУЗКАХ

Минкабирова Г.М., Абдуллаев С.А., Газиев А.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)73-93-64; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: saabdullaev@gmail.com

Исследования циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в биологических жидкостях, для рассмотрения в качестве потенциального биомаркера оценки лучевой реакции животных и человека представляет значительный интерес. Методом ПЦР в режиме реального времени было исследовано изменение общего количества копий трансрентальной (преодолевающей почечный барьер) внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) наряду с ядерной ДНК (вк-ядНК) в моче крыс, после их рентгеновского облучения в дозах 3 и 5 Гр, и в зависимости от пострадиационного времени (от 6 часов до 30 дней). У этих же животных в моче анализировали уровень мутантных копий вк-мтДНК. Мутации определяли по расщеплению CEL-I эндонуклеазой (фермент, расщепляющий неспаренные основания) гетеродуплексов, получаемых путем гибридизации ПЦР-ампликонов вк-мтДНК (Cyt-B - регион) облученных и контрольных образцов. Результаты показали, что уровень общего количества мтДНК и яДНК в моче облученных крыс зависит как от пострадиационного времени, так и от дозы облучения. Так, максимальное количество копий мтДНК и яДНК регистрировалось на 12-24-е часы после их облучения. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению таковым вк-ядНК. Анализ уровня мутантных копий вк-мтДНК показал, что гетеродуплексы, полученные гибридизацией продуктов ПЦР мтДНК до облучения (контроль) и в разные сроки после облучения, расщепляются CEL I эндонуклеазой в большей степени, чем гетеродуплексы, полученные путем смешивания продуктов ПЦР мтДНК контрольного образца. Это указывает на наличие радиационно-индуцированных мутаций в участках вк-мтДНК. Показано, что мутагенез мтДНК имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения. Максимальный уровень мутантных копий мтДНК (гена Cyt-B) приходится на 3-е сутки после облучения. Полученная динамика изменений количества копий общей мтДНК и мутантных копий мтДНК в моче указывает на то, что из тканей облученных животных в пострадиационный период в мочу элиминируются мутантные копии мтДНК. Наблюдаемая элиминация может рассматриваться как результат избирательной дегградации митохондрий, несущих мутантные копии ДНК, так и продолжающейся клеточной гибели в тканях облученных животных. Повышенное содержание циркулирующей внеклеточной мтДНК с мутациями в моче можно рассматривать как потенциальный биомаркер для оценки уровня генотоксического груза при радиационном поражении организма и воздействии других генотоксических агентов.

(Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-31070).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ KE И KEDW С ДНК**DNA interaction with short peptides KE and KEDW**

Морозова Е.А.1,2, Болдырев А.Ю.1, Кузнецова Е.П.2,3, Линькова Н.С.2,3, Хавинсон В.Х.2, Касьяненко Н.А.1

1-Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета 1985046, Санкт-Петербург, Петродворец, ул. Ульяновская, 1

2-Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург

3-Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Телефон: 8(812) 428-43-88 факс 8(812)4287240; e-mail: morozova.kate91@gmail.com

Известно, что короткие пептиды, состоящие из нескольких аминокислотных остатков, выполняют роль сигнальных молекул и участвуют в регуляции биологических процессов. Исследуемые пептиды KE и KEDW были получены классическим способом пептидного синтеза в растворе. KE (Lys-Glu, вилон) – синтетический пептид, созданный на основе фрагмента аминокислотной последовательности, встречающегося в составе эндогенных факторов тимуса и цитокинов. Клинические испытания на животных показали его высокую иммунологическую и репаративную активность. В частности, в опытах на клеточных культурах клеток лимфоцитов человека показан выраженный иммуностимулирующий эффект KE, который проявлялся в усилении экспрессии рецепторов Т-хелперов. KEDW (Lys-Glu-Asp-Trp, панкреаген) – синтетический пептид, созданный на основе анализа аминокислотного состава полипептидов, обладающих инсулинотропным эффектом. В экспериментальных моделях на животных и клеточных культурах установлено, что пептид KEDW способствует дифференцировке стволовых клеток в секреторные клетки островков Лангерганса поджелудочной железы. Таким образом, пептид осуществляет регенерацию секреторной ткани поджелудочной железы. Предполагаемой мишенью действия пептидов является молекула ДНК, поэтому целью исследования стало изучение взаимодействия пептидов KE и KEDW с молекулой ДНК в растворе. Комплексы готовили смешиванием растворов KE или KEDW и ДНК в 5 мМ NaCl. При использовании пептида KEDW было показано уменьшение амплитуды и смещение максимума спектра поглощения ДНК. Для пептида же KE значимых изменений спектральных свойств ДНК после его добавления в раствор обнаружено не было. Для изучения влияния пептида на третичную структуру ДНК применяли метод низкоградиентной вискозиметрии. Были получены значения приведенной вязкости растворов ДНК в присутствии разных концентраций пептидов. Результаты указывали на влияние пептидов на третичную структуры макромолекулы (наблюдалось уменьшение объема молекулярного клубка). Для подтверждения гипотезы о том, что при взаимодействии пептидов с ДНК изменяется жесткость макромолекулы, был использован метод динамического двойного лучепреломления, позволяющий определить оптическую анизотропию статистического сегмента ДНК, которая явно связана с жесткостью макромолекулы. В этом случае было замечено падение оптической анизотропии на 15-20% для каждого пептида, что являлось достаточным подтверждением нашей гипотезы. Совокупность экспериментальных данных позволяет заключить, что пептиды KE и KEDW связываются с молекулой ДНК в процессе проведения экспериментов и влияют на третичную структуру макромолекулы. Кроме того, была выдвинута гипотеза, что в данных, полученных методом спектрофотометрии, именно аминокислота триптофан вызывает все зафиксированные изменения. То есть эта аминокислота непосредственно участвует в образовании комплексов

Работа частично поддержана грантами РФФИ (13-03-01192а) и СПбГУ (11.38.644.2013).

СПЕКТРАЛЬНЫЕ И МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕРМОДИНАМИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Spectral and microcalorimetric studies of thermodynamic of the interaction of DNA with low molecular weight biologically active compounds

Морошкина Е.Б., Осинникова Д.Н.

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

Тел.: +7(812)428-43-88; e-mail: evmorosh@mail.ru

Молекула ДНК является мишенью многих биологически активных соединений. При выяснении молекулярных механизмов действия таких соединений, а также в процессе создания новых лекарственных препаратов проводятся широкие исследования их взаимодействия с ДНК и структуры образующихся комплексов. Необходимым начальным этапом подобных исследований является изучение термодинамики взаимодействия и определение стехиометрии образующихся в конкретных условиях комплексов. С этой целью используются два основных экспериментальных подхода. Первый, традиционный, проводится с помощью различных спектральных методов: спектрофотометрии, кругового дихроизма, флуоресценции. Второй подход, получивший свое распространение сравнительно недавно, основан на применении микрокалориметрии, с помощью которой можно прямым образом получать термодинамические параметры взаимодействия. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки.

В настоящей работе предлагается обзор результатов спектральных и калориметрических исследований взаимодействия ДНК с низкомолекулярными соединениями, содержащими плоский гетероциклический хромофор: антибиотиками, алкалоидами и их синтетическими аналогами. Наличие такого гидрофобного хромофора с одной стороны приводит к равновесному обратимому взаимодействию соединения с двойной спиралью ДНК, а с другой – создает условия для использования спектральных методов при исследовании термодинамики этого взаимодействия. В настоящей работе проводится сравнительный анализ результатов, полученных методами спектрофотометрии и микрокалориметрии.

На основе проведенного анализа можно утверждать, что оба подхода, как правило, дают разные результаты и не могут дублировать друг друга. Это обусловлено, во-первых, различиями в условиях, соблюдение которых необходимо для проведения обоих типов экспериментов. Во-вторых, интерпретация результатов, полученных разными методами, как правило, проводится с использованием различных моделей. Кроме того, можно предположить, что спектральные и тепловые эффекты взаимодействия в ряде случаев отражают разные процессы, происходящие в процессе образования комплекса ДНК-лиганд.

На примере алкалоидов изохинолинового ряда показано, что при наличии сложной системы взаимодействий низкомолекулярного соединения с двойной спиралью ДНК оба метода могут дополнять друг друга, позволяя строить более полные модели связывания.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛКАЛОИДОВ ИЗОХИНОЛИНОВОГО РЯДА С МОЛЕКУЛОЙ ДНК**Interaction of isoquinoline alkaloids with the DNA molecule**

Осинникова Д.Н., Травкина В.И., Морошкина Е.Б.

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

Тел.: +7(812)428-43-88; e-mail: osinnikovadasha@yandex.ru

Природные биологически активные соединения, такие, как антибиотики и алкалоиды, часто являются основой для создания новых лекарственных препаратов. К алкалоидам изохинолинового ряда относятся такие известные лекарственные препараты, как берберин и папаверин. Наличие изохинолинового хромофора у таких соединений обуславливает их способность взаимодействовать с молекулой ДНК.

В настоящей работе исследовано взаимодействие с ДНК ряда синтетических аналогов папаверина, синтезированных в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека Криворотовым Д.В. Термодинамические параметры взаимодействия и стехиометрия образующихся комплексов были получены методами спектрофотометрии и микрокалориметрии. Структура комплексов и способ связывания лиганда с ДНК были определены с помощью методов вискозиметрии и динамического двойного лучепреломления.

Проведенные исследования показали, что взаимодействие с ДНК всех рассмотренных аналогов папаверина носит энтальпийно-энтропийный характер. При этом производные фенацилимидазо[5,1-а]изохинолина связываются с ДНК преимущественно одним способом, незначительно увеличивая характеристическую вязкость и оптическую анизотропию комплекса. Анализ полученных результатов свидетельствует о частичной интеркаляции хромофора этих соединений в двойную спираль ДНК.

Индольные производные изохинолина в данной работе различаются только наличием или расположением одной метильной группы. Исследования показали, что положение этой группы не только влияет на сродство этих лигандов к ДНК, но и определяет способ их связывания с макромолекулой. Соединение, у которого метильная группа расположена на изохинолиновом хромофоре, является интеркалятором, о чем свидетельствует соответствующее увеличение контурной длины макромолекулы. Напротив, расположение метильной группы на индольном кольце препятствует интеркаляции лиганда в двойную спираль ДНК. Наибольшее сродство к ДНК имеет соединение, у которого метильная группа отсутствует. Оно взаимодействует с ДНК несколькими способами, один из которых является интеркаляцией. Вторичное внешнее связывание носит кооперативный характер. Можно предположить, что у индольных производных изохинолина интеркалирующим элементом является индольное кольцо.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК С КООРДИНАЦИОННЫМ СОЕДИНЕНИЕМ ДВУХВАЛЕНТНОЙ ПЛАТИНЫ СО СЛОЖНЫМ ЛИГАНДОМ

DNA interaction with platinum (II) coordination compound with a complex ligand

Павленова К.Н.1, Алексеев Г.В.1, Sengul A.2, Касьяненко Н.А.1

1 – Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета Ульяновская ул. 1, Петродворец, 1985046 Санкт-Петербург

2 – Zonguldak Karaelmas University, Turkey

Телефон: 8(812) 428-43-88 факс 8(812)4287240; e-mail: pavlenova.kristinka@mail.ru

До настоящего времени одним из наиболее часто используемых препаратов для лечения целого ряда опухолей является цисплатин. Несмотря на попытки в течение многих лет найти эффективный заменитель этого очень токсичного соединения, задача до настоящего времени остается актуальной. Изучаемое соединение, синтезированное в лаборатории профессора Сенгюля в университете Зонгулдак Караелмас (Турция), является комплексом двухвалентной платины триаминового типа, во внутренней координационной сфере которого содержится один атом хлора. Сложный гетероциклический лиганд координирован к платине через три атома азота. Таким образом, в координационной сфере платины находятся связанные с ней и между собой остатки пиридина и двух остатков бензимидазола, которые имеют большое сродство к гетероциклическим основаниям нуклеиновых кислот и сами проявляют биологическую активность.

Так как молекула ДНК является основной мишенью действия таких соединений, удобно рассматривать молекулярный механизм действия препаратов этого класса, используя модельные системы – водные растворы ДНК с исследуемым препаратом. В работе использовали коммерческий препарат высокомолекулярной ДНК (Sigma) с молекулярной массой 9×10^6 . Базовый раствор ДНК смешивали с раствором соединения выбранной концентрации. Измерения проводили через сутки после приготовления систем (для образования координационной связи платины с ДНК необходимо время – более 4 часов при комнатной температуре). Содержание соли во всех системах поддерживали постоянным (0,005 M NaCl). Образующиеся комплексы изучали методами электронной спектроскопии (СФ-56, Россия), кругового дихроизма (Mark IV, Jobin Ivon, Франция), низкоградиентной вискозиметрии, двойного лучепреломления в потоке, динамического светорассеяния (Photocor Complex) и люминесценции (Hitachi 850). Изучали влияние препарата на конформацию молекулы ДНК в растворе. Показано, что при взаимодействии соединения с ДНК образуется координационная связь платины с азотистыми основаниями макромолекулы. Равновесие устанавливается через сутки после смешивания растворов препаратов. Лиганд внутренней координационной сферы платины также принимает участие в связывании с молекулой ДНК; при этом не происходит полного отрыва лиганда от платины. При связывании образуется координационная связь платины с ДНК, взаимодействие компонентов оформляется на второй день. Конформационные изменения ДНК при связывании с соединением сходны с наблюдаемыми для цисплатина. При этом, например, изменение объема молекулярного клубка происходит при меньших концентрациях препарата по сравнению с наблюдаемым падением при использовании цисплатина. Совокупность данных показывает, что, наряду с общими чертами в действии изучаемого соединения и цисплатина, в образовании комплекса с молекулой ДНК принимают участие гетероциклические лиганды, модифицирующие влияние платины на конформационные свойства макромолекулы.

Работа частично поддержана грантами РФФИ (13-03-01192а) и СПбГУ (11.38.644.2013).

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕКОДИРОВАНИЯ СТОП-КОДОНА СЕЛЕНОЦИСТЕИНОВОЙ ТРНК**Molecular mechanism of stop codon decoding by selenocysteinyl-tRNA**

Полесскова Е.В. 1, Роднина М.В. 2, Коневега А.Л. 1

1 – НИЦ «Курчатовский институт», Петербургский институт ядерной физики, 188300, Гатчина, Орлова роща

2 – Институт биофизической химии общества Макса Планка, 37077, Германия, Геттинген, Ам Фассберг 11

Тел.: +7(813)714-67-84; факс: +7(813)713-23-03; e-mail: apaleskava@gmail.com

Селеноцистеиновая тРНК (тРНК^{Sec}) – единственная тРНК, которая обуславливает экспрессию целого класса белков, селенобелков. Селенобелки были обнаружены в организмах всех царств живого и являются жизненно необходимыми для позвоночных. Важный микроэлемент селен встраивается в эти белки в процессе трансляции в составе 21 аминокислоты селеноцистеина (Sec). Для этого необходимо наличие специализированного элонгационного фактора SelB и вторичной структуры мРНК SECIS. Детали механизма действия тРНК^{Sec} и SelB на рибосоме не известны, а существующая модель во многом основана на аналогии со стандартными аминоацил-тРНК и элонгационным фактором EF-Tu. Однако различия в нуклеотид- и тРНК-связывающих свойствах SelB и EF-Tu не позволяют провести прямую параллель. В данной работе мы попытались разобраться в функциональных особенностях цикла SelB при помощи изотермальной микрокалориметрии, методов равновесных титрований и быстрой кинетики (методы погашенного и остановленного потоков).

В нашей работе было показано, что при взаимодействии с ГТФ SelB подвергается существенным конформационным изменениям, приобретая более компактную форму. Предположительно, эти структурные изменения необходимы для обеспечения экстраординарно высокой аффинности Sec-тРНК^{Sec} к SelB. Аффинность в субпиколярной области позволяет комплексу SelB·ГТФ·Sec-тРНК^{Sec} достичь рибосомы и рекодировать смысловой кодон UGA (который обычно является стоп-кодonom), успешно конкурируя с системой терминации трансляции. Относительно неспецифичное начальное связывание тройного комплекса со шпилькой мРНК SECIS и рибосомой сменяется кодон-зависимой необратимой реакцией гидролиза ГТФ белком SelB, скорость которой, однако, на несколько порядков ниже, чем в случае EF-Tu. После гидролиза ГТФ SelB переходит в ГДФ-связанную форму, которая обладает отличной от ГТФ-связанной формы степенью компактизации. При этом скорость диссоциации Sec-tRNA^{Sec} от SelB возрастает на шесть порядков. Высвобождение Sec-tRNA^{Sec} от фактора SelB и аккомодация в А сайте рибосомы существенно замедлены по сравнению со скоростями аналогичных реакций стандартных аминоацил-тРНК. Наконец SelB-ГДФ диссоциирует с рибосомы и SECIS, позволяя трансляцию дальнейшей последовательности мРНК.

Таким образом, хотя функциональный цикл Sec-тРНК^{Sec} и SelB принципиально схож с циклом канонических аминоацил-тРНК и EF-Tu, есть существенные различия в константах скорости отдельных этапов. Учитывая, что SelB и EF-Tu связаны лишь отдаленно, можно предположить конвергентную эволюцию функциональных свойств SelB и EF-Tu, вероятно, обусловленную взаимодействием с рибосомой.

АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФРАГМЕНТОВ УОТСОН-КРИКОВСКИХ ДУПЛЕКСОВ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ И КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ.

Understanding conformational features of Watson-Crick duplex fragments by molecular mechanics and quantum mechanics methods

Полтев В.И.1, Анисимов В.М.2, Гарсиа Д.1, Дерябина А.1, Гонсалес Е.1, Санчес К.1, Ривас Ф.1, Полтева Н.А.3

1 – Autonomous University of Puebla, Puebla 72570, Mexico

2 – NCSA, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA

3 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Moscow Region, Russia

Tel.: +52(222)576-55-78; e-mail: poltev@fcfm.buap.mx

It is known that the essential characteristics of DNA double helix originate from the molecular structure of its subunits. However, until now the detailed aspects of the origin of 3D structure of DNA remained insufficiently understood. Our DFT computations of deoxydinucleoside monophosphates dDMPs in complexes with sodium counter-ion revealed the key role of minimal fragments of DNA single chain in the unique features of Watson-Crick (WC) duplexes [1]. We found that the directionality of sugar-phosphate backbone and the preferable ranges of its torsion angles in the single chain, combined with the difference between purines and pyrimidines in ring shape, determine the sequence dependence of three-dimensional structure of the WC DNA [1]. Now, we extend the DFT computations to the minimal fragments of DNA duplex, cdDMPs. Using several computational programs and various functionals, we perform a search for energy minima of BI-conformation for cdDMPs with different nucleoside sequences. Selected sequences are optimized at MP2/6-31++G** level of theory. The analysis of torsion angles, sugar ring puckerings, and mutual base positions demonstrates that the conformational characteristics of optimized structures of cdDMPs remain in BI ranges and become closer to the corresponding characteristics in the duplex crystals than those of dDMPs. Although the quantitative values of the optimized conformational parameters depend on the level of quantum theory; the main general characteristics remain invariant of the computational method. We observe that many of the popular DFT functionals lead to the overestimated distances between base pairs, while MP2 computations and the newer DFT functionals produce the structures having rather short base-pair stacking contacts. Comprehensive DFT study of selected minimal fragments of duplex highlights the complexity of potential energy surface of WC DNA that accounts for variability of conformational parameters of duplex fragments with the same base sequence.

For comparison, molecular mechanics force fields AMBER and CHARMM reproduce most of the conformational characteristics of corresponding BI minima, including complex potential energy surface, but fail to reproduce some sequence-dependent features of cdDMPs.

1. Poltev, V., Anisimov, V.M., Danilov, V.I., et al., Biopolymers, 2014, vol. 101, pp. 640-650.

МОЗАИЧНЫЙ ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН: РОЛЬ ЛОКАЛЬНОГО ОКРУЖЕНИЯ.**Mosaic nature of surface properties in two-component lipid membranes: the role of local environment.*****Пыркова Д.В. 1, Ефремов Р.Г. 1***

1 – Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
email: dpyrkova@gmail.com

Возможности современных экспериментальных методов по изучению процессов, происходящих в клеточных мембранах на молекулярном уровне, до сих пор сильно ограничены. В связи с этим все более распространенными становятся вычислительные технологии атомистического моделирования биомембран, позволяющие существенно дополнить информацию, получаемую в экспериментах. Одним из таких подходов является метод молекулярной динамики (МД), часто применяемый для исследования модельных мембранных систем – гидратированных липидных бислоев.

Свойства бислоя обусловлены не только совокупностью характеристик липидов, входящих в его состав. Большое влияние также оказывают взаимодействия между компонентами мембраны - липидами, молекулами воды, ионами и т.д. При этом важную роль играют непосредственные соседи липидных молекул, т.е. эффекты локального окружения.

При анализе методом МД девяти водно-липидных систем с разными концентрациями отрицательно заряженного диолеилфосфатидилсерина (ДОФС) и цвиттерийного диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) наблюдали неоднородное распределение параметров порядка ацильных цепей липидов (S_{CD}), и молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) на поверхности мембраны. Несмотря на идентичность ацильных цепей липидов, значения S_{CD} для ДОФХ заметно ниже, чем для ДОФС. Кроме того, значения S_{CD} ДОФХ сильно варьируют. Даже при низких концентрациях ДОФС его неполярные цепи сохраняют высокие значения параметров порядка, формируя кластеры с более упорядоченными молекулами ДОФХ. При содержании ДОФС >50% он оказывает упорядочивающее влияние на молекулы ДОФХ, «подстраивая» таким образом свое локальное окружение.

Подобная способность к адаптации позволяет молекулам ДОФС даже при низких концентрациях (т.е. в окружении молекул ДОФХ) сохранять свои структурные и динамические характеристики, близкие к таковым в бислое ДОФС. Присутствие в системе молекул с разными свойствами и их взаимодействия (образование динамических кластеров, водородных связей и пр.) приводит к нелинейной зависимости распределения параметров поверхности бислоя от концентрации отрицательно заряженных липидов (ДОФС). Так, в исследуемых системах наблюдали резкое увеличение степени мозаичности гидрофобных/гидрофильных свойств поверхности при переходе от концентраций, при которых молекулы ДОФС изолированы друг от друга ($\leq 20\%$), к системам, где начинают часто встречаться пары ДОФС-ДОФС ($> 20\%$). Способность мембран «накапливать» ДОФС до определенной концентрации без заметных изменений интегральных характеристик бислоя позволяет им регулировать свои свойства лишь за счет незначительного варьирования липидного состава. Мы полагаем, что такая адаптационная гибкость мембран чрезвычайно важна при их связывании с белками, пептидами и другими молекулами.

СРАВНЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ДНК И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ САЙТОВ НА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ХРОМОСОМЕ

New Comparison of DNA physico-chemical distribution and functional sites location on bacterial chromosome

Сорокин А.А., Темлякова Е.А., Джелядин Т.Р., Камзолова С.Г.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)739-165; факс: +7(4967) 33-05-09; e-mail: lptolik@gmail.com

Экспоненциальный рост числа расшифрованных первичных структур фрагментов ДНК и даже целых геномов требует разработки эффективных методов анализа и интерпретации генетических текстов. Наиболее сложными представляются задачи предсказания функции по первичной структуре специфических участков ДНК, особенно в тех случаях, когда белок по особенностям своего функционирования должен взаимодействовать с большим количеством фрагментов ДНК, имеющих слабую гомологию. Одной из задач этого класса в современной молекулярной биофизике является задача о взаимодействии РНК-полимеразы с промоторами. В настоящее время сформировалось представление о принципах промоторно-полимеразного узнавания, согласно которому не столько нуклеотидная последовательность промоторов, сколько физические свойства, задаваемые этой последовательностью, играют основную роль в формировании промоторной функции [1]. В соответствии с этим представлением большинство современных методов предсказания промоторов используют те или иные физико-химические свойства промоторной ДНК в качестве входных данных.

По результатам анализа доступной литературы было выбрано пять параметров, которые могут давать вклад в вариации величины параметров модели. Профиль электростатического потенциала, который оказывает существенное влияние на неспецифическое взаимодействие РНК полимеразы с ДНК [2]. Три термодинамических параметра: стресс- индуцированная дестабилизация дуплекса (SIDD) [3], при этом вычислительно гораздо удобнее оказалось находить эту величину с помощью пакета модулей Matlab, опубликованного в статье [24]; свободная энергия двойной спирали [5]. Из механических параметров мы выбрали один из наиболее часто используемых: склонность к формированию изгибов [6], которая даст приближенное представление о параметрах образования специфических комплексов. Алгоритмы вычисления всех параметров собраны в библиотеку: профиль электростатического потенциала, свободная энергия дуплекса и склонность к изгибам вычисляется R/Bioconductor библиотекой `reldna`, разработанной в нашей лаборатории, а SIDD вычисляется в среде Octave оригинальными кодами.

Мы проанализировали распределение участков ДНК хромосом четырех бактерий (*Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), наиболее похожих на промоторы *E.coli* по физико-химическим характеристикам ДНК и сравнили его с расположением функциональных и генетических элементов.

1. Камзолова, С.Г. , Докт. дисс., Институт молекулярной биологии АН СССР, 1984.
2. Polozov, R.V., et al., Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1999, vol. 16, pp. 1135-1143.
3. Benham, C.J., Kohwi-Shigematsu, T., and Bode, J., J. Mol Biol., 1997, vol. 274, pp. 181-19.
4. Michoel, T. and Van de Peer, Y., Phys. Rev. E, 2006, vol. 73, p. 011908.
5. Rangannan, V. and Bansal, M., Bioinformatics, 2010, vol. 26, pp. 3043-3050.
6. Brukner, I., Sanchez, R., Suck, D., and Pongor, S., The EMBO Journal, 1995, vol. 14, pp. 1812-1818.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИМЕРНОГО АНАЛОГА ДИСТАМИЦИНА С ПОЛИ(DA)•ПОЛИ(DT), ПОЛИ[D(A-T)]•ПОЛИ[D(A-T)] И МИНИМАЛЬНОГО ДУПЛЕКСА Ori23 В НАЧАЛЕ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА**Interaction of a bis-linked distamycin analog with poly(dA)•poly(dT), poly[d(A-T)]•poly[d(A-T)] and minimal duplex Ori23 in replication origin of herpes virus*****Суровая А.Н.1, Бажулина Н.П.1, Лепехина С.Ю.1, Андропова В.Л.1,2, Галегов Г.А.2, Гроховский С.Л.1, Гурский Г.В.1***

1 – Институт молекулярной биол. им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

2 – Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Министерства здравоохранения РФ, 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16

e-mail: annasur@eimb.ru; swetlana.lepehina@gmail.com

В ходе настоящей работы проведены исследования связывания димерного аналога бис-дистамицина (Pt-bis-Dst) с ДНК с помощью UV и КД спектроскопии, подвижности комплексов при электрофорезе в геле и ДНКазного футпринтинга. Отличительными особенностями синтетического полиамида от природного антибиотика является то, что в нем два дистамициновых фрагмента соединены с помощью глицинированной цис-диаминоплатиновой группы. Данные футпринтинга показывают, что Pt-bis-Dst избирательно связывается с А+Т кластером в начале репликации OriS вируса герпеса и защищает А+Т кластер от расщепления ДНКазой I. С помощью КД спектроскопии исследовано связывание Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)], поли(dA)•поли(dT) и дуплексом Ori23 с последовательностью 5'-GCCAATATATATATTATTAGG-3', который присутствует в начале репликации OriS вируса герпеса. Показано, что связывание Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)] и поли(dA)•поли(dT) достигает насыщения, если одна молекула лиганда приходится примерно на 8 пар оснований. При дальнейшем увеличении отношения добавленного лиганда к парам оснований в спектрах КД комплексов с поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)] наблюдается смещение максимума длинноволновой полосы в сторону больших длин волн, а в области спектра 290-310 нм появляется "плечо", которое отсутствовало в спектрах комплексов, полученных при низких заполнениях полимера лигандом. При высоких отношениях концентрации лиганда к концентрации олигонуклеотида Pt-bis-Dst может связываться с поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)] в форме шпильки и может образовывать ассоциаты за счет взаимодействия между дистамициновыми фрагментами соседних молекул Pt-bis-Dst. Структура комплексов стабилизируется взаимодействиями между пирролкарбоксамидными фрагментами половинок двух соседних молекул Pt-bis-Dst, адсорбированных на перекрывающихся связывающих местах. Эти взаимодействия, вероятно, также ответственны за спектральные изменения при образовании комплекса второго типа между Pt-bis-Dst и поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)]. Спектральные изменения практически отсутствуют при связывании Pt-bis-Dst с поли(dA)•поли(dT). Связывание Pt-bis-Dst с дуплексом Ori23 достигает насыщения, если примерно 2 молекулы лиганда приходится на дуплекс, содержащий кластер из 18 АТ-пар. При увеличении отношения концентраций лиганда к дуплексу спектры КД претерпевают концентрационно-зависимые изменения, аналогичные тем, которые наблюдаются при связывании Pt-bis-Dst с поли[d(A-T)]•поли[d(A-T)]. Испытания противовирусной активности Pt-bis-Dst показали, что концентрация IC50, при которой цитопатический эффект, вызываемый вирусом герпеса в культуре клеток Vero E6 уменьшается в два раза, равна 1.5 мкг/мл, а индекс селективности противовирусного действия равен 65 при относительно невысокой цитотоксичности. Концентрация Pt-bis-Dst, при которой погибает примерно половина клеток, равна 100 мкг/мл.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-01269 и Программой Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

ОРГАНИЗОВАННЫЕ БИО-НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОСТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК

Organized bio-inorganic nanostructures based on the DNA complexes

Хомутов Г.Б.

Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы 1, стр.2.

Тел.: +7(495)939-30-25; e-mail: gbk@mail.ru

Создание и исследование организованных наноструктур и наноматериалов на основе комплексов функциональных неорганических наночастиц и биомолекул представляют в настоящее время большой интерес с фундаментальной и прикладной точек зрения. Важнейшая биологическая молекула – ДНК – играет в этих исследованиях существенную роль, связанную с выяснением фундаментальных механизмов взаимодействия ДНК с лигандами различной природы и с созданием новых эффективных систем анализа структуры ДНК и средств диагностики, а также новых практических подходов в генной терапии. В данном сообщении представлены результаты работ по формированию и исследованию организованных био-неорганических наноструктур на основе молекул ДНК, а также комплексов ДНК, спермина и амфифильных поликатионов, локализованных в объемной водной фазе и на границе раздела фаз. Неорганической нано-фазой было Au, Ag, CdSe, магнитные оксиды железа. Полученные наноструктуры охарактеризованы методами ПЭМ, АСМ, оптической спектроскопии, ЭМР спектроскопии. С использованием иммобилизованных молекул ДНК в качестве линейной адсорбирующей матрицы нами были впервые созданы квази-линейные структуры из полупроводниковых нано-стержней CdSe, флуоресценция которых носила существенно поляризованный характер. Установлено, что взаимодействие молекул ДНК с катионами железа (II) приводит к образованию квази-тороидальных наноструктур, характерных для процессов конденсации ДНК в биологических и модельных системах с участием поликатионов. Установлено, что в системе, включающей молекулы ДНК и ионы железа (Fe^{3+} или Fe^{2+}) в ходе иницируемых окислительно-восстановительных процессов образуются организованные ансамбли магнитных наночастиц оксидов железа (магнетит, маггемит) со средним размером наночастиц 7 нм. Исследованы процессы биоминерализации, приводящие к формированию организованных ансамблей магнитных наночастиц оксида железа в комплексах молекул ДНК в реакциях с участием реагентов в том числе биологической природы (ферритина в качестве источника ионов железа, аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя) в водной фазе при нормальных условиях. Иммобилизованные монослойные комплексы молекул ДНК инкубировались в водном растворе ферритина, а затем, после промывки в чистой воде, помещались в раствор восстановителя (аскорбиновой кислоты или борогидрида натрия). В результате, по данным ПЭМ, в реакционной системе образовывались квази-линейные ансамбли неорганических наночастиц с характерными размерами 3-5 нм и кристаллической структурой, соответствующей магнитным оксидам железа (магнетит, маггемит). Полученные результаты указывают на возможность образования организованных ансамблей магнитных наночастиц оксида железа в комплексах ДНК при определенных условиях и могут иметь отношение к процессам биоминерализации и метаболизма железа в живых системах, приводящим к формированию биогенных магнитных наночастиц. Также представлены результаты по формированию металлических наночастиц Au и Ag, а также наночастиц оксидов железа в био-нанореакторах на основе поликомплексов ДНК-спермина в объемной водной фазе.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант 14-12-01379).

ПРЕДСКАЗАНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПРОМОТОРОВ В E.COLI НА ОСНОВЕ ДАННЫХ О РАСПРЕДЕЛЕНИИ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВДОЛЬ МОЛЕКУЛЫ ДНК**Promoter prediction in E.coli based on analysis of electrostatic potential distribution around DNA**

Темлякова Е.А., Дзелядин Т.Р., Камзолова С.Г., Сорокин А.А.

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3;

Тел.: +7(4967)730165; факс: +7 (4967)330509; evgenia.teml@gmail.com

Промоторы – небольшие участки ДНК (около 60 п.о.), располагающиеся перед точкой старта транскрипции и участвующие в процессе связывания РНК-полимеразы. Их нуклеотидные последовательности имеют ряд хорошо описанных закономерностей (элементов), играющих важную роль в процессах ДНК-белкового распознавания и инициации транскрипции: гексонуклеотиды -10 и -35 областей, спейсер между ними, АТ-богатые участки в upstream области. Поиск промоторных последовательностей сильно осложнен двумя обстоятельствами: во-первых, не каждый промотор обладает всем набором указанных элементов; во-вторых, описанные выше области часто сильно варьируют в нуклеотидном составе, что в свою очередь обеспечивает тонкую регуляцию кинетической силы каждого промотора в отдельности. Таким образом, возникает необходимость в поиске каких-то дополнительных характеристик промоторов, на основе которых было бы возможно более точно обнаруживать эти важнейшие регуляторные участки генома.

В данной работе была продемонстрирована возможность использования характеристик распределения электростатического потенциала вдоль молекулы ДНК для поиска промоторов. Построены классификационные модели, позволяющие разделять промоторные и непромоторные последовательности (случайные бернуллиевские, кодирующие, псевдопромоторы) с точностью порядка 83–85%. Определены наиболее значимые участки для такого разделения, по-видимому, играющие важную роль при ДНК-полимеразном узнавании. Характеристики точности предсказаний, полученные при помощи наших классификационных моделей, были сопоставлены с аналогичными характеристиками для методов, опирающихся на поиск закономерностей в нуклеотидном составе промоторов. Было показано, что наш метод дает на 30–40 % большую селективность при поиске промоторов, что при анализе полной хромосомы *E.coli* приводит к сокращению ложных срабатываний (определение непромоторной области как промоторной) примерно в два раза.

Распределение электростатического потенциала рассчитывалось при помощи метода, использующего уравнение Пуассона-Больцмана [1], и значительно более быстрого подхода на основе формулы Кулона [2]. Разница в полученных результатах проанализирована и представлена.

Работа поддержана грантом РФФИ No14-04-31793-мол_а.

1. Baker N.A., Sept D. et al. / PNAS, 2001, Vol.98(18), P. 10037-10041.
2. Polozov R. V., Dzhelyadin T. R. et al. / J. Biomol. Struct. Dyn., 1999, Vol.16(6). P. 1135–1143.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С ЯДЕРНЫМИ БЕЛКАМИ H1 И HMGB

Structural and functional features of the interaction between DNA and nuclear proteins H1 and HMGB

Чихиржина Е.1, Костылева Е.1, Старкова Т.1, Поляничко А.1,2

1 – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9

Тел. +7(812)297-37-40; факс +7(812)297-35-41; e-mail: chikhir@gmail.com

ДНК в ядре эукариотической клетки находится в виде сложного нуклеопротеинового комплекса – хроматина, обладающего способностью к компактизации и декомпактизации при своем функционировании. В основе механизма компактизации хроматина лежит взаимодействие ДНК с гистоновыми и негистоновыми белками. Линкерный гистон H1 связан с межнуклеосомной ДНК и играет важную роль в формировании структур высших (наднуклеосомных) уровней организации хроматина. Функционирование линкерного гистона лежит в основе структурной организации хроматина в клетках различных организмов, которые отличаются не только по своим функциям, но и по транскрипционной активности и степени компактности ДНК в ядре. Среди негистоновых белков хроматина наиболее распространенными являются белки большого семейства HMGB-доменных белков. В составе этих белков есть ДНК-связывающий HMGB-домен, который обнаружен во многих транскрипционных факторах. Белок HMGB1 зачастую рассматривается как «архитектурный» фактор транскрипции. Он принимает непосредственное участие в процессах транскрипции, рекомбинации, репликации.

В работе с помощью различных биофизических методов нами были исследованы структурные особенности комплексов ДНК с линкерными гистонами семейства H1, с негистоновым хромосомным белком HMGB1, а также структура тройного комплекса ДНК-H1-HMGB1. Было показано, что степень компактизации ДНК зависит от особенностей вторичной и третичной структуры гистонов H1. Анализ результатов сравнительного исследования хроматина в транскрипционно неактивных и активных клетках показал, что присутствие обогащенных аргинином линкерных белков и большая длина линкерной ДНК обеспечивают плотную упаковку нуклеосом и суперкомпактное состояние хроматина в транскрипционно неактивных клетках. Важную роль во взаимодействии белка HMGB1 с ДНК играет неструктурированный отрицательно заряженный С-концевой домен белка. В его отсутствие с ДНК взаимодействуют оба ДНК-связывающих домена HMGB1. Анализ структуры тройного комплекса показал, что белки взаимодействуют с ДНК независимо. Гистон H1 связывается не только с сахаро-фосфатным остовом ДНК, но и с С-концевым доменом белка HMGB1. С помощью метода атомной силовой микроскопии было показано, что при взаимодействии ДНК с HMGB1 в присутствии гистона H1 образуются фибриллоподобные структуры. Каждая индивидуальная фибрилла образуется несколькими молекулами ДНК, связанными между собой белками. Взаимодействие гистона H1 и белка HMGB1 скорее носит кооперативный характер, чем конкурентный.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№№ 15-04-06993, 15-08-06876) и Администрации Санкт-Петербурга. Часть работ выполнена с использованием оборудования РЦ научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники», «Развитие молекулярных и клеточных технологий»; ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ» при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИАММИНОДИХЛОРПЛАТИНЫ(II) С ДНК И БЕЛКАМИ**The interaction of diamminodichlorplatinum(II) with DNA and proteins****Чихиржина Е.В. 2, Белая И.А. 1, Баталова А.А. 1, Поляничко А.М. 1,2**

1 – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

2 – Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9

Тел. +7(812)297-37-40; факс +7(812)297-35-41; e-mail: chikhir@gmail.com

Цис-диамминодихлорплатина(II) (цис-ДДП) – противоопухолевый препарат, основной мишенью которого является ДНК. Противоопухолевый агент связываясь с ДНК, искажает ее структуру, что, в конечном итоге, ведет к гибели клетки. Основную часть всех повреждений ДНК составляют внутринитевые сшивки цис-ДДП с атомами N7 соседних пуриновых оснований. Именно благодаря этим сшивкам цис-ДДП обладает противоопухолевой активностью, в отличие от транс-ДДП, которая не способна образовывать аддукты такого типа. ДНК в ядре находится в составе хроматина, структура которого стабилизируется гистоновыми белками. Гистоны связываются с ДНК, оказывая существенное влияние на ее функционирование в клетке, в т.ч. и на механизм биологического действия противоопухолевых препаратов. .

Работа посвящена исследованию механизмов действия комплексов цис-ДДП и транс-ДДП с ДНК и архитектурными белками хроматина. Взаимодействие белков с ДДП изучалось с помощью метода гель-электрофореза и аналитического ультрацентрифугирования. В качестве метода по определению характера связывания ДДП с ДНК и белками был использован метод ИК-спектроскопия. В качестве контрольного белка для ИК-спектроскопии был выбран БСА (Бычий Сывороточный Альбумин). Анализ полученных результатов выявил взаимодействие ДДП с гистонами H3 и H4. При этом с помощью используемых в работе методов взаимодействие ДДП с линкерным гистоном H1 не было обнаружено. Показано, что цис-ДДП образует внутримолекулярные сшивки в гистоне H3. В работе установлено, что связывание цис-ДДП приводит к изменению вторичной структуры БСА. Эксперименты, проведенные с комплексами ДДП-ДНК, позволили установить, что цис-ДДП и транс-ДДП преимущественно взаимодействуют с гуанином; цис-ДДП, в отличие от транс-ДДП, изменяет конформацию сахарофосфатного остова. Во всех исследованных комплексах геометрия сахарофосфатного остова ДНК соответствует В-форме.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№№ 15-04-06993, 15-08-06876) и Администрации г. Санкт-Петербурга. Часть работ была выполнена с использованием оборудования РЦ научного парка СПбГУ «Оптические и лазерные методы исследования вещества», «Диагностика функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники», «Развитие молекулярных и клеточных технологий»

ЛИПОПЛЕКСЫ ДИКАТИОННЫХ ГЕМИНАЛЬНЫХ ПАВ С ДНК: СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФЕКЦИИ

Lipoplexes of dicationic gemini surfactants with DNA: structural features of DNA compaction and transfection efficiency

Файзуллин Д.А.1, Захарова Л.Я.2, Покровский А.Г.3, Коробейников В.А.3, Зуев Ю.Ф.1

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 30

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, 420088 Казань, ул. Арбузова, 8

3 – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Тел.: +7(843)231-90-36; e-mail: yufzuev@mail.ru

Современный прогресс в области генной терапии и диагностики связан разработкой новых невирусных векторов [1]. Катионные соединения защищают ДНК от деградации нуклеазами и являются посредниками при проникновении в клетку с последующим высвобождением из эндосом, что повышает эффективность трансфекции.

Целью настоящей работы было исследование внутренней структуры липоплексов ДНК с гидроксилсодержащими алкиламмонийными геминальными ПАВ (ГПАВ). В работе использовали бутанидил-1,4-бис(гидроксиэтилметилгексадециламмоний бромид) (16-4-16(OH)); гексанидил-1,6-бис(гидроксиэтилметилгексадециламмоний бромид) (16-6-16(OH)); додеканидил-1,12-бис(гидроксиэтилметилгексадециламмоний бромид) (16-12-16(OH)). Структурные перестройки комплексов ГПАВ с палиндромным олигонуклеотидом (ONu) gcg-tta-acg-c исследовались методом кругового дихроизма (КД).

Установлено, что при увеличении мольного отношения ГПАВ/ONu наблюдаются изменения в спектрах КД, характерные для перехода вторичной структуры нуклеотида из формы В в С с последующим образованием супрамолекулярных хиральных структур (ψ -фаза ДНК) [2]. Для ГПАВ 16-12-16(OH) и 16-6-16(OH) пороговая концентрация, при достижении которой начинается образование супрамолекулярных комплексов, находится вблизи соответствующей ККМ, а соединение 16-4-16(OH) образует хиральные супрамолекулярные комплексы с ONu при концентрациях существенно выше ККМ. Комплексы с новой структурой склонны к агрегации, что регистрируется по росту светорассеяния в спектрах поглощения. Структурные данные для комплексов ГПАВ/ONu были сопоставлены с концентрационными зависимостями эффективности трансфекционной активности этих ГПАВ в отношении плазмиды rEGFP-N1 размером 5100 пар оснований и клеток НЕК293Т (эмбриональный почечный эпителий человека) плазмиды размером 5100 п.н., экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок [3]. Показано, что эффективность трансфекции клеток НЕК293Т плазмидой rEGFP-N1 отлична от нуля лишь в области существования хиральных супрамолекулярных комплексов ДНК - ГПАВ и достигает максимума при концентрациях, близких к спонтанной агрегации компонент.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 15-29-01239 офу_м.

1. Mintzer, M.A. and Simanek, E.E., Chem. Rev., 2009, vol. 109, pp. 259-302.

2. Shin, Y.A. and Eichhorn, G.L., Biopolymers, 1984, vol. 23, pp. 325-335.

3. Григорьев, И.В., Коробейников, В.А., и др., Доклады Академии наук, 2012, т. 445, сс. 349-352.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ ДЛЯ КРИМИНАЛИСТИКИ**Biological microarrays for forensic purposes**

Фесенко Д.О., Наседкина Т.В., Заседателев А.С.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32;
Тел.: +7(499)135-98-46; факс: +7(499)135-14-05; e-mail: deferos@yandex.ru

Одной из задач современной криминалистики является получение поисковой информации о преступнике по его биологическим следам (кровь, слюна, сперма, потожировые следы, волосы, и проч.). Наиболее перспективным методом получения такой информации является исследование ДНК. В случае если идентифицирующий признак (STR-профиль) не дал совпадений с имеющейся базой данных (что и случается чаще всего), следствию могут помочь поисковые признаки, определяемые по этому же биологическому следу. Мы разработали высокочувствительные тест-системы для определения ряда признаков, для которых известна четкая генетическая детерминированность: половая принадлежность искомого лица, группа крови, цвет глаз и основные евразийские гаплогруппы Y хромосомы (позволяющие выявить этнические особенности фамилии и отчества, а также этническое происхождение подозреваемого по отцу). Тест-системы созданы на основе технологии гидрогелевых биологических микрочипов.

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК В ПРОЦЕССЕ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ ПРИ НИЗКИХ ТОКАХ

DNA damage in electrospray at low currents

Шляпников Ю.М., Шляпникова Е.А., Морозов В.Н.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3

Тел.: +7(495)632-78-69; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: office@iteb.ru

Электрораспыление при низких токах является эффективным средством получения различных препаратов, в частности, лекарственных средств, в наноаэрозольной форме для лечения различных лёгочных заболеваний. Ранее нами показано, что в процессе электрораспыления при токах ниже 100 нА белки и ферменты сохраняют свои нативные свойства. При этом не выявлено образования в значительных количествах активных форм кислорода, способных вызвать химическое повреждение молекул распыляемого вещества [1]. Целью данной работы является исследование возможного повреждения в процессе электрораспыления в условиях образования наноаэрозоля молекул ДНК. Для этого методом электрофореза в агарозном геле исследованы продукты электрораспыления линейных двухцепочечных фрагментов ДНК длиной 4-50 тысяч пар оснований. Показано, что при токах около 100 нА ДНК подвергается механической деструкции. Степень повреждения увеличивается при уменьшении скорости потока распыляемого вещества и увеличении длины фрагмента ДНК. Предложен способ защиты молекул ДНК от механических повреждений.

1. Morozov, V.N. and Morozova, T.Ya., Anal. Chem., 1999, vol. 71, pp. 1415-1420.

2. Kanev, I.L., Mikheev, A.Y., Shlyapnikov, Y.M., Shlyapnikova, E.A., Morozova, T.Y., and Morozov, V.N., Anal. Chem., 2014, vol. 86, pp. 1511-1517.

О МЕХАНИЧЕСКОМ АНАЛОГЕ МОЛЕКУЛЫ ДНК**On the mechanical analog of DNA****Якушевич Л.В.**

Институт биофизики клетки РАН, 142292, Пушкино, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)739-252; факс: +7(4967)330-509; e-mail: kind@mail.ru

Молекула ДНК рассматривается как нелинейная одномерная решетка, которая обладает регулярной частью, сформированной периодически повторяющимися сахарами и фосфатными группами, и нерегулярной частью, образованной последовательностью азотистых оснований: аденинов, тиминов, гуанинов и цитозинов, [1]. Полезным инструментом для изучения внутренней динамики такой решетки и визуализации различных динамических режимов, которые возможны в ДНК, могла бы стать механическая модель ДНК. В настоящей работе представлен математический алгоритм построения этой модели в виде цепочки из N связанных неодинаковых маятников четырех видов: А, Т, Г и С, расположенных в последовательности, аналогичной последовательности оснований в ДНК. Найдены соотношения между параметрами механической модели (массами маятников m_n , длинами маятников r_n , расстояниями между соседними маятниками a , жесткостью пружин, связывающих маятники, k) и параметрами ДНК. Для иллюстрации полученных результатов рассчитаны параметры механической модели, имитирующей промоторную последовательность бактериофага T7D.

1. Якушевич, Л.В., Нелинейная физика ДНК, Москва-Ижевск: РХД, 2007.

**Биофизика клетки.
Мембранные процессы**

СЕНСОРНЫЕ СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННЫХ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГРАМИЦИДИНОМ D ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ ФИЗКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Artificial bilayer lipid membranes modified gramicidin D sensor features under variation of physical and chemical factors

Адельянов А.М.1, Яковенко Л.В.1

1 – МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, ГСП-1, д. 1 стр. 2, физический факультет

Тел.: +7(495)939-30-07; факс: +7(495)932-88-20; e-mail: adelyanov@physics.msu.ru

Мембраны играют исключительную роль в жизнедеятельности клеток. На них протекают важнейшие биохимические реакции клетки, они являются структурным каркасом многих клеточных органелл и т.п. Биологические мембраны обладают чувствительностью к внешним физико-химическим воздействиям. Несмотря на то, что главный вклад, обуславливающий функциональность биологических мембран, вносит их белковая составляющая, в данной работе рассматривались модельные искусственные бислойные липидные мембраны, и их способность реагировать на изменения внешних физико-химических условий. Это сделано во-первых из-за того, что реальные биологические мембраны даже простейших бактерий содержат большое количество белков, что делает изучение поведения таких систем весьма сложным, во-вторых, для того, чтобы проверить гипотезу о наличии сенсорных свойств чисто липидных мембран без белковых компонент. О наличии, либо отсутствии таких свойств искусственных бислойных липидных мембран автор судит из статистического анализа записи временных рядов проводимости таких мембран при различных условиях. Для повышения проводимости мембрана была модифицирована пентадекапептидом каналоформером грамицидином D. Димер грамицидина проявляет селективную проводимость к моновалентным катионам. Хотя этот белок не является потенциал зависимым каналом, тем не менее, есть теоретические и экспериментальные предпосылки того, что пептид может проявлять кооперативные свойства в ответ как на изменения разности потенциалов, так и на изменение физико-химического состояния системы опосредовано через малейшие конформационные (флуктуационные) изменения самой мембраны. Таким образом, автор проверяет гипотезу о том, что грамицидин может выступать в роли усилителя сенсорной способности искусственной бислойной липидной мембраны чувствительной к слабым изменениям физических и химических условий. Разрабатывается подход к диагностике различных состояний мембраны на основе классических методов анализа временных рядов.

1. Биомембраны. Структура, функции, методы исследования, под ред. Бекера, М.Е. и Дубура, Г.Я., Рига: ЗИНАТНЕ, 1977, с. 277.
 2. Borisenko, V., Gramicidin derivatives as membrane-based pH sensors, ВВА, 2002, vol. 1558, pp. 26-33.
- Чен, И., Мембраны. Ионные каналы, М.: Мир, 1981, сс. 284-317.

ИЗМЕНЕНИЕ ФАЗОВОГО СОСТОЯНИЯ ЛИПИДОВ В СТРУКТУРЕ МОДЕЛЬНЫХ МУЛЬТИЛАММЕЛЯРНЫХ ЛИПОСОМ ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ МЕМБРАН**Phase changing of lipids at structures of model multilamellar liposomes under variable membrane melting**

Алексеева О.М.1, Кременцова А.В.1, Шибряева Л.С.1, Ким Ю.А.2

1 – Институт Биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля, 119334, Москва, Косыгина 4,

2 – Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл., Институтская ул., 3

Тел.: +7(495)939-74-09; факс: +7(499)137-41-07; e-mail: olgavek@yandex.ru

С помощью дифференциальной адиабатной микрокалориметрии (ДСК) исследовалось изменение фазового состояния липидов в составе мультиламеллярных липосом, состоящих из множественных вложенных друг в друга бислойных мембран. Подобные липосомы являются хорошей моделью внутриклеточных многослойных образований, таких как аппарат Гольджи, митохондрии, эндо и саркоплазматический ретикулумы, приближенные к внешней мембране в клетке. Методом ДСК преимущественно изучаются фазовые переходы при плавлении индивидуальных фосфолипидов. Липосомы формировались из ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолина, синтетического насыщенного нейтрального фосфолипида. Форма молекулы ДМФХ – цилиндрическая: небольшая фосфатная головка и два одинаковых остатка миристиновой кислоты. Это способствует образованию в водных средах бислойных мембран небольшой кривизны. При гидратировании в фосфатном буфере при температуре выше основного фазового перехода высушенных в аргоне тонких пленок ДМФХ бислойные мембраны собираются в мультиламеллярные липосомы [1]. Образцы разбавленной взвеси (0,15 мг/мл) таких липосом в фосфатном буфере плавил с помощью ДСК при температурах от 4 С⁰ до 40 С⁰. Изменения термодинамических параметров фиксировали, используя два подхода к термической обработке мембран. Первый – при варьировании скорости прогрева (1 град/мин, 0,5 град/мин, 0,25 град/мин, 0,125 град/мин). И второй – при нескольких повторях прогрева и охлаждения образцов. Такие подходы имитируют изменения температур на органеллах, как в отдельных компартаментах клетки, так и в целой клетке. Помимо локальных клеточных изменений температуры мембраны, значительное снижение температуры происходит при гибернации, при выходе из состояния спячки температура на мембранах, напротив, повышается. Такие же изменения, но менее значимые, происходят и при обычном сне [2]. Эндотермические переходы отражают 3-фазовых состояния (гель-фаза; риппл-фаза; жидко-кристаллическая фаза) липидов в бислоях. Примененные подходы позволили промоделировать изменения тонкой (микродоменной) структуры фосфолипидных локусов бислоя при физиологических процессах. Так, было обнаружено, что теплопоглощение при варьировании скорости прогрева образцов ДМФХ снижается в 7 раз при снижении скорости с 1 до 0,125 град/мин. Температурный максимум, при котором происходит основной фазовый переход, снижается на 0,8 градуса, кооперативность перехода повышается более чем на 10%. Т.е. мембрана становится более легкоплавкой. Применение второго подхода выявило неравномерность изменения теплопоглощения, снижение температуры плавления бислоя, и падение кооперативности перехода на 20% при увеличении количества повторов нагревания-охлаждения. По-видимому, упорядоченность мембраны уменьшается. Полученные результаты указывают на значительные изменения фазового состояния фосфолипидного бислоя при варьировании температуры в модельной мембране.

1. Тараховский, Ю.С., Ким, Ю.А., и др., Биофизика, 2008, т. 53, №1, сс. 78-84.

2. Харакоз, Д.П., Успехи Биол. Наук, 2001, т. 41, сс. 264-333.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК *DUNALIELLA* В УСЛОВИЯХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Antioxidant activity of *Dunaliella* cells in the low temperature stress

Али-заде Г.И., Алиев И.И., Магеррамова Х.Х., Галандарли И.З.

Бакинский государственный университет, AZ1148, ул. З.Халилова, 23.

E-mail: qalizadeh@mail.ru

При действии низкой температуры в клетках растений развивается окислительный стресс, связанный с повышенной продукцией активных форм кислорода (АФК). Баланс между образованием и обезвреживанием АФК имеет решающее значение для выживания растений при стрессе. Для предотвращения негативного и опасного влияния АФК у растений существует двухкомпонентная антиоксидантная система защиты, включающая антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные органические соединения.

Целью являлось изучение показателей роста, пигментообразования, каталазной активности и содержания МДА в контрольных клетках *Dunaliella* и выращенных при подаче в фотореакторы воздушной смеси с температурой 10⁰ и 5⁰С (низкотемпературный стресс).

Объектом исследования служила зеленая галофильная одноклеточная микроводоросль *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выделенная из соленых озер Абшерона и введенная в культуру. Водоросли выращивали при 27⁰С в фотореакторах (250 мл), на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей. Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре. Активность каталазы измеряли газометрическим методом. Оценка степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) была проведена по методу определения содержания МДА в клетках – методом, основанным на реакции с тиобарбитуровой кислотой.

На основании проведенных исследований показано, что выращивание контрольной суспензии клеток в оптимальных условиях (температура 27⁰С, интенсивность света 16 Вт/м², парциальное давление углекислоты, минеральная среда Абдуллаева – Семененко) в 250 мл стеклянных фотореакторах при интенсивно-накопительном режиме культивирования (24ч.) и подаче в фотореакторы воздушной смеси с температурой 25⁰С, оптическая плотность клеточной суспензии увеличивается в 3,5-4 раза.

Показано, что снижение температуры воздушной смеси, подаваемые в фотореакторы до 10⁰ и 5⁰С, подавляет рост и биопродуктивность клеточной суспензии на 10% и 18-20% соответственно по сравнению с оптимально контрольными суспензиями. Содержание хлорофиллов (Хл_а и Хл_б) в результате снижения температуры до 10⁰С и 5⁰С приводит к увеличению их количества (50%). Количество биосинтеза каротиноидов увеличивалось до 50% (10⁰С) и несколько снижалось до 35-40% (5⁰С) по сравнению оптимально контрольными клетками. Каталаязная активность клеток *Dunaliella* при низкотемпературном стрессе существенно увеличивалось по сравнению оптимально контрольными клетками. Уровень содержания МДА в клетках при низкотемпературном стрессе несколько снизилось.

Обсуждаются механизмы действия низких положительных температур на низкомолекулярные и высокомолекулярные соединения антиоксидантной системы клеток *Dunaliella*.

ВЛИЯНИЕ ГУАНИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ И ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ**Effect of guanidine compounds on the structural state of membranes and the surface charge of lymphocytes****Ананян А.А.1, Милютин Н.П.1, Бернхардт И.2, Внуков В.В.1**

1 – Кафедра биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии Южного Федерального университета, 344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки 194/1,

2 – Университет Земли Саар, Саарбрюккен, Германия

e-mail: aananyan@sfedu.ru

В настоящее время вещества, содержащие гуанидиновую группу, активно изучаются и синтезируются. Известно, что гуанидиновые соединения могут проявлять разнообразные биологические и фармацевтические эффекты, что определяет их использование в качестве лекарственных препаратов различного назначения. Цель работы – исследование в модельных экспериментах влияния ряда гуанидиновых соединений – аргинина, аргининовой кислоты, канаванина, гомоаргинина, N - α - ацетиларгинина, α - кето – δ - гуанидиновалериановой кислоты, гуанидиномасляной и гуанидиноянтарной кислот (в концентрациях, близких к физиологическим) на структурные параметры и поверхностный заряд мембран лимфоцитов человека. Методом латеральной диффузии флуоресцентного зонда пирена установлено, что под влиянием большинства исследованных гуанидиновых соединений, за исключением аргинина, α-кето-δ-гуанидиновалериановой и гуанидиноянтарной кислот, наблюдается повышение текучести гидрофобных доменов липидного бислоя мембран лимфоцитов, тогда как микровязкость зон белок-липидных контактов, или аннулярных липидов, не изменяется. Инкубации лимфоцитов с большинством из изученных веществ, за исключением гомоаргинина и гуанидиноянтарной кислоты, приводит к увеличению эффективности безызлучательного переноса энергии с триптофановых остатков мембранных белков на пирен. Эти изменения могут быть следствием различных причин, среди которых увеличение степени погружения мембранных белков в липидный матрикс, изменение белок-липидных взаимодействий, адсорбция на поверхности мембран веществ пептидной природы, олигомеризация мембранных белков и др. Структурные перестройки мембран лимфоцитов сопровождаются снижением коэффициента $F_{372/393}(334)$, что свидетельствует об умеренном уменьшении полярности липидного бислоя, что может способствовать повышению их термодинамической стабильности. Исследование поверхностного заряда мембран лимфоцитов с помощью флуоресцентного зонда-аниона 1,8-АНС показывает, что инкубация суспензии лимфоцитов гуанидиновыми соединениями, за исключением N-α-ацетиларгинина, гуанидиномасляной и аргининовой кислот, вызывает увеличение интенсивности флуоресценции зонда 1,8-АНС вследствие повышения количества центров связывания зонда-аниона с поверхностью мембраны. Таким образом, в опытах *in vitro* показано, что изученные гуанидиновые соединения оказывают существенное влияние на структурные параметры мембраны лимфоцитов, среди которых к важнейшим относятся микровязкость липидного бислоя и поверхностный заряд мембран.

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕРХНОСТНОЙ АРХИТЕКТониКИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА УГЛЕРОДА

Features of superficial architectonics of human blood erythrocytes after exposure to carbon monoxide

Артюхов В.Г.1, Тюнина О.И.2

1 – Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

2 – Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

Тел.: 8 473 2208-981; artyukhov@bio.vsu.ru

Развитие патологических процессов в результате воздействия различных токсинов может сопровождаться изменением поверхностной архитектоники эритроцитов крови человека. Сравнительно недавно было установлено, что СО является нормальным метаболитом в организме человека (В.А Коржов, А.В. Видмаченко, 2010). Это вещество образуется в процессе деградации гема под влиянием гем-оксигеназы и используется в качестве мессенджера и регулятора многих физиологических функций.

В связи с вышесказанным целью исследования явилось изучение поверхностной архитектоники эритроцитов крови человека после воздействия монооксида углерода, который получали лабораторным способом по химической реакции между концентрированными серной и муравьиной кислотами. Экспозиция эритроцитов в атмосфере СО составляла 60, 75 и 90 мин. После СО-модификации анализируемые клетки фиксировали в 2,5 % глutarовом альдегиде, обезвоживали в серии водных растворов этанола восходящей концентрации и далее – в ацетоне. Поверхностную архитектуру эритроцитов крови доноров изучали на сканирующем электронном микроскопе «JSM-6380 LU» (Япония) при ускоряющем напряжении 20-25 кВ.

При морфологическом исследовании рельефа поверхности эритроцитов было показано, что в контрольных образцах крови подавляющее большинство эритроцитов имеют форму дискоцитов (93,17±1,07%). После воздействия на исследуемые клетки крови СО в течение 60 мин происходит образование межклеточных контактов с конечным результатом – агрегацией эритроцитарных клеток. Среди переходных форм эритроцитов, которые способны к обратимой деформации, увеличивалось содержание эллипсов (на 20,2%), дискоцитов с одним (на 17,6%) и множественными выростами (на 4,67%) по сравнению с их количеством в крови контрольной группы. В результате последующей СО-модификации продолжительностью 75 мин выявляется существенное изменение дискообразной формы эритроцитов с образованием дискоцитов в виде «спущенного мяча» (23,5±1,6%), что характеризуется нарушением рельефа клеточной поверхности, образованием выростов на поверхности эритроцитов и уменьшением их размеров. При анализе СО-модифицированных в течение 90 мин эритроцитов выявляется возрастание степени агрегации изучаемых клеток с еще большим отклонением от нормы: они принимают сферическую форму, видны участки эритроцитарных мембран, нарушается рельеф клеточной поверхности.

Таким образом, при длительном воздействии монооксида углерода на эритроциты крови человека (75, 90 мин) происходит увеличение числа клеток с множественными выростами эритроцитов «в виде спущенного мяча» и, как следствие, – изменение поверхностной архитектоники анализируемых нами клеток; обсуждаются биофизические аспекты наблюдаемых эффектов и процессов в эритроцитарных клетках.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИНОЗИТОЛТРИФОСФАТ-КИНАЗЫ И ФОСФОЛИПАЗЫ-С В ФОРМИРОВАНИИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ТРОМБОЦИТОВ.**Theoretical investigation of the role of inositol triphosphate-kinase and phospholipase-C in the formation of platelet subpopulations*****Балабин Ф.А. 1, Свешникова А.Н. 1,2***

1 – Физический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, 117198, Москва, Саморы Машела, 1 email: fedpost@mail.ru

Известно, что в популяции активированных тромбоцитов наблюдается разделение клеток на субпопуляции, как по морфологии, так и по роли в свертывании крови [1]. Активация тромбоцита может быть инициирована различными агонистами (тромбин, коллаген, АДФ и т.п.) путем взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки, при этом большинство сигнальных каскадов сходятся на фосфолипазе С (PLC). Этот фермент вызывает выход инозитолтрифосфата (IP3) в цитоплазму клетки, и последующий выход ионов кальция в цитоплазму из эндоплазматического ретикулума. Ионы кальция являются важнейшим вторичным мессенджером в активации тромбоцита, будучи кофактором для ряда ферментов, непосредственно ответственных за протекание этого процесса. Именно динамика концентрации кальция определяет разделение тромбоцитов на субпопуляции [2].

В настоящей работе исследуется роль регуляции ионами кальция активностей PLC и инозитолтрифосфат-3-киназы (IP3K) в разделении тромбоцитов на субпопуляции в рамках математической модели активации тромбоцита через PAR1 рецептор [2]. Согласно данным о зависимости активности PLC от концентрации кальция в цитоплазме [3] в модель была введена положительная обратная связь. Была добавлена отрицательная обратная связь, обусловленная активностью IP3K. Интегрирование модели проводилось стохастическим методом tau-lear в среде COPASI.

В нашей предыдущей работе было показано, что положительная обратная связь через PLC приводит к гиперинтенсивному ответу тромбоцита и не может функционировать без компенсирующего механизма [4]. Введение отрицательной обратной связи через IP3K приводит к формированию ответов, при которых на промежутке времени в 5-30 секунд наблюдаются колебания концентрации кальция с постоянной амплитудой и длительностью, зависящей от интенсивности первичного стимула со стороны активатора. В модели наблюдается возникновение порога активации, генерация колебаний концентрации кальция и стабилизация концентрации кальция на уровне, заданном константой полуактивации IP3K. При стохастической симуляции в зависимости от начальной концентрации активатора наблюдается перераспределение различных ответов тромбоцитов на активацию. При этом наблюдается четыре различных варианта ответа тромбоцита, позволяющих описать разделение популяции тромбоцитов на субпопуляции в зависимости от концентрации активатора.

1. Topalov, N.N., et.al., Br. J. Haematol., 2012, vol. 157, pp. 105-115.

2. Sveshnikova, A.N., Ataulakhanov, F.I., and Panteleev, M.A., Mol. BioSyst., 2015, vol. 11, pp. 1052-1060. Rebecchi, M.J. and Pentylala, S.N., Physiol. Rev., 2000, vol. 80, pp. 1291-1335.

3. Балабин, Ф.А. и Свешникова, А.Н., Роль кальциевой регуляции активности фосфолипазы-С в активации тромбоцита, Математика. Компьютер. Образование, 2014, тезисы, вып. 21, Анализ сложных биологических систем, с. 14.

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА НА УПРУГИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Cholesterol effect on elastic properties of unsaturated lipid bilayers

Башкиров П.В.1,2, Чекашкина К.В.1,2, Кузьмин П.И.2, Фролов В.А.3,4

1 – ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а;

2 – ИФХЭ РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, д.31, корп. 4;

3 – Biophysics Unit (CSIC, UPV/EHU) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of The Basque Country, 48940, Spain, Leioa;

4 – IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011, Spain, Bilbao

Тел: +7(926)4583581; e-mail: bashkirov@mail.ru

Холестерин жизненно важный компонент клеточных мембран эукариотов, где он обычно содержится в большой концентрации (например, более 20wt% в плазматической мембране). Влияние холестерина на структурные, термодинамические и механические свойства мембран сильно зависит от липидного окружения. Согласно большому количеству исследований воздействие холестерина на мембрану зависит от степени насыщенности жирнокислотных остатков липидов: чем выше содержание ненасыщенных связей, тем слабее эффект холестерина. Особенно это заметно, когда речь идет о модуле изгибной жесткости липидного бислоя. Согласно современным наблюдениям холестерин вызывает существенное увеличение модуля изгиба насыщенных бислоев, в то время как модуль изгиба бислоев, образованных из ненасыщенных липидов, не изменяется даже при 40% концентрации холестерина. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого явления, до сих пор не установлен. Существует предположение, что основную роль играет расположение и ориентация молекулы холестерина внутри гидрофобной прослойки липидного бислоя. В данной работе мы демонстрируем, что холестерин может вызывать сильное (вплоть до пятикратного) увеличение модуля изгиба мембраны, сформированной из диолеоилфосфатидилхолина (ДОФХ), если он добавляется в 1:1 мольном соотношении с лизолипидом ОФХ. Мы связываем наше наблюдение со способностью холестерина и ОФХ формировать плотно упакованный гетеродимер за счет образования водородных связей между собой. Исчезновение чувствительности к кривизне мембраны у молекулы ОФХ в присутствии холестерина в соотношении 1:1 подтверждает наше предположение о формировании гетеродимера. Примечательно, разрушение водородных связей с помощью хаотропных агентов снова нарушает способность холестерина увеличивать изгибную жесткость мембраны и восстанавливает чувствительность к геометрической кривизне у молекулы ОФХ. Таким образом мы заключаем, что увеличение изгибной жесткости мембраны холестерином возможно достичь в жидких ненасыщенных липидных бислоях, если холестерин при этом связывается с лизолипидами. Здесь мы обсуждаем возможный механизм данного эффекта.

АКТИВНОСТЬ КАСПАЗЫ-3 И ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА В «МОЛОДЫХ» ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**Activity of caspase-3 and phosphatidylserine redistribution in «young» erythrocytes under oxidative stress**

Белевич Е.И., Костин Д.Г., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», 220072 Республика Беларусь, Минск, ул Академическая, 27, e-mail: Catherina_Bel_@tut.by

Вопрос об участии каспаз в процессе эриптоза (запрограммированной гибели эритроцитов) пока остается открытым, несмотря на то, что показана роль каспазы-3 в развитии эриптоза при диабете второго типа и почечной недостаточности [1, 2], а также выявлена активность каспазы-3 в выделенных из суммарной популяции, аннексин-V-положительных эритроцитах [3]. Значимость каспазы-3 для развития эриптоза подвергается сомнению из-за более низкого содержания этого фермента в эритроцитах по сравнению с ядерными клетками [1]. Известно, что течение ряда заболеваний сопровождается окислительным стрессом и повышенным эриптозом [4, 5]. В процессе своей жизнедеятельности эритроциты также подвергаются окислительному стрессу, что способствует их старению. Цель работы – на модели эриптоза, вызванного окислительным стрессом, выяснить, активируется ли каспаза-3 во фракции «молодых» эритроцитов, а также определить степень экспонирования фосфатидилсерина (ФС) на поверхности клетки, как маркера эриптоза. Фракцию «молодых» эритроцитов получали путем центрифугирования в градиенте плотности «Перколл-БСА». Активность каспазы-3 определяли, используя флуорогенный субстрат FITC-DEVD-fmk и ингибитор каспаз Z-VAD-fmk, а перераспределение ФС – с помощью FITC- меченного аннексина V. Окислительный стресс вызывали в эритроцитах с помощью 2 mM трет-бутилгидроперекиси (t-BHP). Показано, что при t-BHP-индуцированном окислительном стрессе во фракции «молодых» эритроцитов происходит увеличение интенсивности флуоресценции расщепленного субстрата FITC-DEVD-fmk в 6,4 раза по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации эффекторной каспазы-3. В «молодых» эритроцитах, предварительно нагруженных нефлуоресцирующим ингибитором каспаз Z-VAD-fmk и далее подвергшихся окислительному стрессу, интенсивность флуоресценции FITC-меченного субстрата не отличалась от таковой в контрольных клетках. Это позволяет заключить, что флуорогенный субстрат FITC-DEVD-fmk подвергается расщеплению в эритроцитах именно активированной каспазой-3. Инкубация «молодых» эритроцитов с 2 mM t-BHP приводит к увеличению интенсивности флуоресценции FITC-меченого аннексина-V в 30 раз по сравнению с контрольными «молодыми» клетками, что свидетельствует о перераспределении ФС из внутреннего во внешний монослой мембраны эритроцитов. В то же время в «молодых» эритроцитах, предварительно нагруженных нефлуоресцентным ингибитором каспаз Z-VAD-fmk и далее подвергшихся окислительному стрессу, интенсивность флуоресценции FITC-меченого аннексина-V не отличалась от таковой в контрольных клетках, из чего следует, что перераспределения ФС из внутреннего во внешний монослой плазматической мембраны не происходило. Полученные данные позволяют заключить, что в условиях окислительного стресса в «молодых» эритроцитах *in vitro* происходит активация каспазы-3 и перераспределение ФС из внутреннего во внешний монослой плазматической мембраны, что указывает на участие каспазы-3 в процессе эриптоза.

1. Maellaro, E., et al., Acta. Diabetol., 2013, vol. 50, no. 4, pp. 489-495.
2. Polak-Jonkisz, D., et al., Clin. Biochem., 2013, vol. 46, pp. 219-224.
3. Bratosin, D., et al., Cytometry A, 2009, no. 75A, pp. 236-244.
4. Calderón-Salinas J. V. et al., Mol. Cell. Biochem., 2011, vol. 357, nos. 1-2, pp. 171-179.
5. Mahmud, H., et al., Cardiovasc. Res., 2013, vol. 98, no. 1, pp. 37-46.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОЛИПАЗ A₂ С БИСЛОЙНЫМИ ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Interaction of the inhibitors of phospholipase A₂ with bilayer lipid membranes

Белослудцев К.Н.1, Белослудцев М.Н.1,2, Дубинин М.В.1,3

1 – ИТЭБ РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3;

2 – ГБОУ ВПО Кировская ГМА Минздрава России, 610027, г. Киров, ул. К. Маркса, 112;

3 – ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет», 424001, Йошкар-Ола, пл. Ленина 1.

Тел.: +7(4967)73-94-76; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: bekonik@gmail.com

Фосфолипазы A₂ (ФлA₂) – ферменты, катализирующие гидролиз мембранных фосфолипидов по sn-2 положению, что приводит к высвобождению свободных жирных кислот и лизофосфолипидов. В организме млекопитающих выявлено более 30 ферментов, обладающих фосфолипазной активностью. При этом большинство ФлA₂ относится к 3 семействам – секроторным ФлA₂, а также цитозольным Ca²⁺-зависимым и Ca²⁺-независимым ФлA₂. Согласно современным представлениям, фосфолипазы A₂ играют важную роль в метаболизме арахидоновой кислоты, гомеостазе мембранных липидов (и, как следствие, поддержании структуры и упаковки мембран), энергетическом метаболизме клетки, а также участвуют в различных про- и противовоспалительных биологических процессах. Баланс в работе фосфолипаз A₂ позволяет организму стабильно функционировать. Однако, при развитии ряда патологий этот баланс может нарушаться, и, в этом случае, ФлA₂ являются ферментами, «вредными» для клеток организма. На сегодняшний день для каждого семейства ФлA₂ известны свои ингибиторы. Исходя из патофизиологической роли ФлA₂ кажется привлекательным использование их ингибиторов в качестве лекарственных средств. Действительно, применение ингибиторов предотвращает развитие клеточной гибели, терапевтический эффект ингибиторов наблюдается при лечении многих заболеваний связанных с нарушением метаболизма арахидоновой кислоты и канцерогенезе. Однако, ряд ингибиторов могут подавлять работу не только ФлA₂, но и других ферментов, в том числе и мембранных транспортных белков. Более того, химическая структура многих ингибиторов (гидрофобность ингибиторов) подразумевает, что они, по всей видимости, будут взаимодействовать непосредственно с липидными мембранами. Можно предположить, что при этом будет происходить нарушение упорядоченности структуры мембраны и изменение их проницаемости для различных ионов и более крупных молекул. Это, в свою очередь, может быть причиной гибели клеток. Особенно ярко это может быть выражено, когда ингибиторы используются в высоких концентрациях. Целью настоящей работы является изучение взаимодействия ингибиторов фосфолипазы A₂ с бислойными липидными мембранами. В работе показано: 1) ингибиторы ФлA₂ арахидонилтрифторметил кетон (AACOCF₃) и трифторперазин (ТФП) понижают температуру фазового перехода ДПФХ липосом и понижают степень упорядоченности мембраны в зоне фосфолипидных головок. В то же время пальмитоилтрифторметил кетон (PACOCF₃) увеличивал как температуру фазового перехода, так и степень упорядоченности мембраны. 2) ТФП индуцировал проводимость бислойных липидных мембран (БЛМ) и липосом. Эффективность AACOCF₃ и PACOCF₃ как индукторов пермеабилитации мембран была значительно ниже 3) Встраивание ТФП, AACOCF₃ и PACOCF₃ приводит к увеличению среднего размера липосом.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-34-50346-мол_нр и 15-04-03081-а.

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ ПОВЕРХНОСТНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ОТКРЫТИЕ ЛИПИДНОЙ ПОРЫ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАЛЬМИТИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И Ca^{2+} , В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНАХ**Effect of surface-potential modulators on the opening of lipid pores in liposomal and mitochondrial inner membranes induced by palmitate and calcium ions*****Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д., Белослудцев К.Н.***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3
Тел.: +7(4967)73-94-76; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: bekonik@gmail.com

Свободные жирные кислоты обладают множеством биологических эффектов, в том числе оказывают влияние на функционирование митохондрий. Они являются субстратами дыхания митохондрий, разобщителями окислительного фосфорилирования, индукторами митохондриальной МРТ поры и проапоптотическими агентами. В начале 2000-х г.г. было показано, что насыщенные жирные кислоты в присутствии ионов Ca^{2+} способны индуцировать открытие циклоспорин А-нечувствительной поры во внутренней мембране митохондрий. Мы обнаружили, что открытие поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и Ca^{2+} , может происходить не только в митохондриальной мембране, но и в цитоплазматической мембране эритроцитов, а также искусственных липидных мембранах – БЛМ и липосомах. Таким образом, было предположено, что пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированная пора имеет липидную природу. В основе механизма образования такой поры лежит способность анионов насыщенных жирных кислот образовывать прочные комплексы с Ca^{2+} в липидном бислое с последующей их сегрегацией в твердокристаллические мембранные домены и появлением гидрофильных липидных пор. Исходя из того, что образование пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры в мембране является следствием ламеллярного фазового перехода в мембране, можно ожидать, что регуляция такой поры осуществляется при изменении физико-химических свойств мембраны. Изменение свойств липидной мембраны, в частности фазового состояния, зависит от целого ряда факторов, к которым относятся температура, давление, концентрация ионов Ca^{2+} и других низкомолекулярных соединений (в том числе, и жирных кислот), взаимодействующих с мембраной. Кроме того, к таким факторам относят поверхностный потенциал мембраны, который определяется присутствием в мембране ионизированных полярных групп фосфолипидов и белков. Цель настоящей работы заключается в исследовании влияния модуляторов поверхностного потенциала на пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированную пермеабиллизацию липосомальных и митохондриальных мембран. В работе получены следующие результаты: 1) Амплитуда и скорость пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированного циклоспорин А-нечувствительного набухания митохондрий печени и сердца крыс, существенно ниже в среде, содержащей ионы K^+ , по сравнению со средой, содержащей сахарозу/маннитол. 2) Высокая ионная сила раствора существенно ингибирует пальмитат/ Ca^{2+} -зависимую пермеабиллизацию липосом. 3) Анионный детергент SDS и отрицательно-заряженный фосфолипид кардиолипин увеличивают величину отрицательного ζ потенциала липосом, в то время как катионный детергент СТАВ изменял значение ζ потенциала липосом с отрицательного на положительный. 4) Присутствие СТАВ в липосомальной и митохондриальной мембране подавляло образование пальмитат/ Ca^{2+} -индуцированной поры, в то время как присутствие SDS или кардиолипина стимулировало образование поры.

Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-03081-а и Правительства РФ №14.Z50.31.0028.

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА МЕХАНИЧЕСКОЕ НАПРЯЖЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Influence of hydrogen sulfide on the mechanical tension of rat aortic smooth muscles in hypoxia

Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Ковалев И.В., Носарев А.В.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, 634050, Томск, Московский тр., 2

Тел.: 8(3822)901-101; e-mail: birulina20@yandex.ru

Сероводород (H_2S), будучи газовым посредником, вовлечен во многие физиологические и патологические процессы, протекающие в организме [1]. Несомненно, также его участие в поддержании миогенного тонуса сосудов. Предполагается, что H_2S может оказывать влияние на индуцируемое гипоксией снижение сократительной способности сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК) [2]. Изучались эффекты донора сероводорода – гидросульфида натрия ($NaHS$) на сократительную активность деэндотелизированных гладкомышечных сегментов (ГМС) аорты крыс-самцов Вистар в условиях нормоксии и гипоксии. Условия гипоксии создавали путем пропускания газообразного азота (N_2) через растворы тестируемых соединений. В качестве предсокращающих агентов выступали гиперкалиевый раствор Кребса (KCL, 30 мМ) и α 1-адреномиметик фенилэфрин (ФЭ, 1 мкМ). Сократительные ответы ГМС оценивали методом механографии с использованием механографической установки Myobath II/LAB-TRAX-4/16 (Германия). Статистическую значимость различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни (U test Mann-Whitney) на уровне $p < 0.05$. Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($X \pm m$). Инкубация сосудистых ГМС в гипоксическом растворе Кребса в течение 60 минут не влияла на их исходный базальный тонус. Однако в условиях гипоксии происходило снижение амплитуды гиперкалиевого сократительного ответа ГМК до $83.1 \pm 2.9\%$ ($n=8$, $p < 0.05$), ФЭ-индуцированного – до $73.4 \pm 2.5\%$ ($n=8$, $p < 0.05$) от контрольного при нормоксии. $NaHS$ в концентрациях 5-1000 мкМ не влиял на исходное механическое напряжение (МН) гладких мышц аорты крысы в условиях нормоксии, но в концентрациях 5-50 мкМ вызывал увеличение МН сегментов до $18.5 \pm 3.5\%$, предсокращенных гиперкалиевым раствором, тогда как в концентрациях 500 и 1000 мкМ оказывал релаксирующий эффект. На фоне ФЭ-индуцированного сокращения ГМК добавление 5-1000 мкМ $NaHS$ приводило к дозозависимому снижению МН сегментов. В условиях гипоксии добавление $NaHS$ в концентрации 200 мкМ, близкой к EC_{50} , приводило к достоверному снижению сократительной активности ГМС. При блокировании калиевых каналов плазмалеммы тетраэтиламмонием (ТЭА, 10 мМ) расслабляющее действие 200 мкМ $NaHS$ при гипоксии ГМК ослаблялось, как на фоне действия гиперкалиевого раствора, так и фенилэфрина. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при гипоксии происходит снижение сократительной способности гладких мышц аорты крысы, а добавление H_2S оказывает дополнительный вазорелаксирующий эффект, который обусловлен активацией калиевой проводимости мембраны ГМК.

1. Elsey, D.J., Fowkes, R.C., and Baxter, G.F., Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H_2S), Cell Biochem. Funct., 2010, vol. 28, pp. 95-106.
2. Olson, K.R., Hydrogen sulfide as an oxygen sensor, Clin. Chem. Lab. Med., 2013, vol. 51, no. 3, pp. 623-632.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ЛИПИДНЫХ РАФТОВ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ**Computer simulation of lipid raft dynamics*****Боздаганян М.Е.1, Шайтан К.В.2***

1 – Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28

2 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1 корп.12

E-mail: m.bozdaganyan@gmail.com

Большое количество экспериментов указывает на то, что в мембране есть наноразмерные области, обогащенные сфингомиелином и холестерином – «рафты» (от англ. raft – плот), которые играют важную роль в функциональной активности клетки: мембранного транспорта, передачи сигнала, регуляции активности мембранных белков и т.д.

Целью настоящей работы было исследование формирования и структуры рафта методом молекулярной динамики (МД) с использованием программного пакета GROMACS (в тяжелоатомном приближении) из трех липидов: пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ), холестерина (ХОЛ) и сфингомиелина (СМ). Для расчета свободной энергии взаимодействия липидов использовался метод метадинамики. Основное внимание было уделено таким характеристикам рафта как размер, толщина, коэффициенты диффузии, параметры порядка ацильных цепей.

В результате проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Молекулы холестерина играют главную роль в формировании и поддержании стабильности рафта, взаимодействуя с молекулами сфингомиелина (т.н. «зонтичный эффект»). Это подтверждается также результатами расчетов свободной энергии пар липидов между собой.
2. Липиды в рафте имеют фазу L_0 . За формирование кристаллической структуры отвечают молекулы сфингомиелина.
3. Данные, полученные из МД, хорошо согласуются с экспериментальными данными: в частности, совпадает толщина мембраны и коэффициенты диффузии липидов.
4. Рафт – стабильная структура мембраны, не нарушающая ее целостности, со временем жизни не менее 0,3 мкс.

ВЛИЯНИЕ ТАМОКСИФЕНА НА МУСКАРИНОВЫЕ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В АМНИОНЕ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Effect of tamoxifen on muscarinic cholinergic reactions in chick amnion

Бойко О.В.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26
Тел.: +7(499)135-55-27; e-mail: olga.boiko@idbras.ru

В настоящее время наряду с двумя ядерными эстрогеновыми рецепторами (ER- α и ER- β) идентифицирован мембранный G-белок сопряженный рецептор, связывающий эстрогены, что позволило выявить экстраядерные механизмы, опосредующие негеномные физиологические реакции на эстрогены [1]. Большая группа исследований посвящена быстрым эффектам эстрогенов и антиэстрогенов на гладкомышечные ткани. Обсуждаются негеномные механизмы и сигнальные пути эстрогеновых мембранных рецепторов, активирующие различные внутриклеточные процессы, регулирующие сосудистые функции и клеточный рост. Тамоксифен, нестероидный препарат, широко используемый в лечении рака молочной железы с положительным статусом эстрогеновых рецепторов, является селективным модулятором эстрогеновых рецепторов. Активность его отличается тканеспецифичностью, то есть в разных тканях он может действовать как агонист или антагонист. Антипролиферативное действие тамоксифена связывают не только с его активностью в отношении рецепторов эстрогенов, но и с воздействием на холинергические рецепторные механизмы, кальциевые каналы, исследуется NO-зависимость эффектов [2, 3, 4]. Неспецифическое действие тамоксифена на реализацию мускариновых реакций в амнионе ранее не исследовалось. В амниотической ткани отсутствуют нервные элементы, что показано как для зародышей птиц, так и млекопитающих. При этом амнион обладает чувствительностью к широкому спектру биологически активных веществ, в том числе к нейротрансмиттерам. Сократительная активность амниона куриного эмбриона, вызванная холинергическими агонистами, опосредуется популяцией M_3 -холинорецепторов и стимуляцией фосфоинозитидной системы, в реализации сигнала участвует Ca^{2+} , поступающий в цитоплазму клетки экзогенно через каналы L-типа и мобилизуемый из внутриклеточных запасов [5, 6]. Регистрацию сокращений изолированной полоски амниона 11-13-суточного куриного эмбриона проводили в изометрическом режиме. Исходная нагрузка на препарат составляла 100 мг. Показано, что тамоксифен в микромолярных концентрациях быстро тормозит спонтанную сократительную активность амниона куриного эмбриона: частота сокращений падает до 55% от исходной, а амплитуда сокращений – до 57%. Тоническая реакция на карбахол (50 мкМ) на фоне действия тамоксифена (5 мкМ, 10 мин) снижается на 42% по сравнению с контролем. Реакция является дозозависимой. Обсуждаются механизмы действия тамоксифена на мускариновую реакцию в амнионе, в том числе включающие блокаду кальциевых каналов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-0400845.

1. Meyer, M.R., et al., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, vol. 308, nos. 1-2, pp. 9-16.
2. Batra, S., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1990, vol. 26, pp. 310-312.
3. Morley, P. and Whitfield, J.F., *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, no. 1, pp. 69-74.
4. Miller, V.M. and Duckles, S.P., *Pharmacol. Rev.*, 2008, vol. 60, no. 2, pp. 210-241.
5. Бойко О.В. и Манухин Б.Н., *Онтогенез*, 2009, т. 40, №4, сс. 254-260.
6. Бойко О.В. и Манухин Б.Н., *Известия РАН серия биол.*, 2014, №1, сс. 1-5.

ГЕНЕРАЦИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ЗОНЫ НА ПОВЕРХНОСТИ МЕЖДОУЗЛИЯ CHARA CORALLINA ПРИ МИКРОПЕРФОРАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ**Generation of alkaline zone on the surface of Chara corallina internodes after microperforation of the cell wall**

Булычев А.А., Иванов М.В., Комарова А.В., Крупенина Н.А, Рубин А.Б.

Биологический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-35-03; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

С помощью H^+ -селективных сурьмяных микроэлектродов измеряли щелочные сдвиги рН на поверхности интернодальных клеток *C. corallina* (pH_o), вызываемые микроперфорацией клеточной стенки на разных расстояниях (до 150 мкм) от точки нанесения микроукола стеклянной микроиглой с диаметром кончика ~ 1 мкм. Показано, что увеличение расстояния d между кончиками стимулирующей иглы и рН-микросенсора сопровождается увеличением латентного периода ответной реакции на укол (локальное защелачивание до $pH \sim 9.5$), а также уменьшением амплитуды изменений pH_o . Кинетические кривые изменений pH_o на разных расстояниях от точки микроукола описываются в первом приближении уравнением диффузии интермедиата после его мгновенного высвобождения в цитозоле в точке укола. По данным о времени достижения пика pH_o от момента укола при разных зазорах d найдены значения эффективного коэффициента диффузии D_{eff} цитоплазматического интермедиата – участника механорецепции. Значения D_{eff} на малых расстояниях d (вблизи точки микроукола) составили $\sim 10^{-7}$ см²/с. Поскольку сдвиги pH_o при микроперфорации зависели от содержания Ca^{2+} в среде и в цитоплазме и подавлялись при блокировании Ca^{2+} -каналов ионами La^{3+} , Gd^{3+} и Zn^{2+} , было предположено, что посредником локального возрастания pH_o служит Ca^{2+} , поступающий из среды в цитоплазму по механочувствительным каналам [1, 2]. Найденное значение D_{eff} было ниже, чем D_{Ca} в воде ($6 \cdot 10^{-6}$ см²/с), но оно соответствует литературным данным о коэффициенте диффузии Ca^{2+} в цитоплазме; это подтверждает предположение о роли Ca^{2+} в качестве посредника, активирующего транспорт протонов. При смещениях датчика рН от точки микроукола в направлении течения цитоплазмы значения D_{eff} возрастали с увеличением расстояния d . Следовательно, на больших расстояниях d перенос интермедиата облегчается за счет потока цитоплазмы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при микроперфорации клеточной стенки уровень Ca^{2+} возрастает в неподвижном слое цитоплазмы – в эктоплазме, примыкающей к плазмалемме. В этом случае распространение Ca^{2+} определяется его диффузией, модулируемой потоком жидкости. Влияние движения цитоплазмы на геометрию щелочной зоны проявляется в том, что профиль распределения рН асимметричен относительно точки укола и вытянут в направлении потока цитоплазмы.

1. Bulychev, A.A., Alova, A.V., and Bibikova, T.N., Biochim. Biophys. Acta., 2013, vol. 1828, pp. 2359-2369.
2. Bulychev, A.A. and Komarova, A.V., Protoplasma, 2014, vol. 251, pp. 1481-1490.

МОДУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ НИТРАТА СЕРЕБРА НА МУЛЬТИБИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ: ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Modulation of the effects of silver nitrate on multibilayer lipid membranes: thermodynamic aspects

Ващенко О.В.1, Красникова А.О.1, Будянская Л.В.2, Касян Н.А.1, Лисецкий Л.Н.1

1 – Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, 61001, Харьков, пр. Ленина, 60

2 – Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразна, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4

Тел.: +38(057)341-03-58; факс: +38(057)340-44-74; e-mail: olga_v@isma.kharkov.ua

Нитрат серебра (AgNO_3) используется как действующее вещество в различных препаратах серебра. Известно, что одним из главных объектов воздействия серебра является клеточная мембрана, причём как её белковая компонента, так и липидный бислой. Действие AgNO_3 на липидный бислой определено как уплотняющее, что согласуется с его низкой способностью к всасыванию; при этом NO_3^- оказывает разрыхляющее действие [1]. Возникает вопрос изменения (модуляции) исходного действия нитрата серебра в присутствии других компонентов, как это наблюдалось для некоторых фармпрепаратов [2, 3].

В настоящей работе использованы мультислойные липидные мембраны, широко используемые в биофизических исследованиях в качестве структур, моделирующих липидный бислой биомембран. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) были исследованы мультислойные мембраны *L*- α -димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), содержащие пары $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$ и $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, а также *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), содержащие пару $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$. Для каждой из исследованных систем общая концентрация нитратов в воде сохранялась одинаковой (3 масс. %), при этом их мольное соотношение варьировалось от 0,0 до 1,0. Такая постановка эксперимента, согласно [4], позволяла выявить отклонения получаемых термодинамических параметров от аддитивности, т.е. эффекты модуляции действия AgNO_3 .

Для пары $\text{AgNO}_3 - \text{NaNO}_3$ установлено отклонение температуры основного фазового перехода (T_m) от аддитивности в сторону ослабления первичного эффекта AgNO_3 (антагонизм) с максимумом, соответствующим эквимольному содержанию нитратов. Для пары $\text{AgNO}_3 - \text{KNO}_3$ при эквимольном содержании нитратов зарегистрирован максимум отклонения T_m от аддитивности в сторону усиления первичного эффекта AgNO_3 (синергизм). Интересно, что такое соотношение близко к содержанию AgNO_3 в препарате ляпис, который представляет собой сплав AgNO_3 и KNO_3 . Полученный эффект модуляции можно трактовать как усиление уплотняющего действия и ухудшение всасывания препарата по сравнению с чистым AgNO_3 . Для пары $\text{AgNO}_3 - \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ также наблюдался синергизм, однако, максимум соответствовал содержанию $\text{AgNO}_3 \sim 0,3$.

Таким образом, первичное действие AgNO_3 может модулироваться присутствием других веществ даже без образования химических связей либо стабильных комплексов. В этом случае можно говорить о взаимодействии, опосредованном средой, – гидратным окружением либо липидной мембраной.

1. Ващенко, О.В., Ермак, Ю.Л., и др., Биофизика, 2015, т. 60, вып. 2, сс. 307-315.
2. Caruso, B., Sánchez, J.M., et al., Cell Biochem. Biophys., 2012. DOI 10.1007/s12013-012-9494-3.
3. Kasian, N.A., Pashynska, V.A., et al., Mol. BioSyst., 2014, vol. 10, pp. 3155-3162.
4. Фиалков, Ю.Я., и др., Физическая химия неводных растворов, Л.: Химия, 1973.

ВЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНО-АДРЕСОВАННОГО АНТИОКСИДАНТА SKQ1 НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ, СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**Influence of mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on free radical oxidation, the membrane structural state and apoptosis of rat lymphocytes in oxidative stress**

Внуков В.В., Даниленко А.О., Милютин Н.П., Ананян А.А., , Гуценко О.И.

Кафедра биохимии и микробиологии, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского Южного Федерального университета, 344090, Ростов-на-Дону, просп. Стачки 194/1

e-mail: natmilut@rambler.ru

Цель работы состояла в исследовании влияния митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 на интенсивность свободнорадикального окисления (СРО), структурное состояние мембран и уровень апоптоза лимфоцитов крови крыс при ГБО-индуцированном окислительном стрессе (ОС). Установлено, что ГБО-индуцированный ОС (0,5 МПа, 90 мин) характеризуется накоплением молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах лимфоцитов: содержание молекулярных продуктов ПОЛ возрастает на 45-53%. Предварительное введение SkQ1 (50 нмоль/кг, 5 дней) в физиологических условиях не вызывает изменений уровня продуктов ПОЛ в лимфоцитах, но предотвращает повышение интенсивности СРО при ОС.

Исследование структурных свойств мембран лимфоцитов методом латеральной диффузии флуоресцентного зонда пирена показывает, что текучесть липидного бислоя мембран лимфоцитов при ОС снижается на 18%, тогда как текучесть зон белок-липидных контактов, или аннулярных липидов, возрастает на 31%. При этом наблюдается повышение уровня структурных перестроек мембранных белков лимфоцитов. Введение SkQ1 не вызывает достоверных изменений структурных параметров мембран лимфоцитов крыс в условиях физиологической нормы, тогда как введение SkQ1 перед сеансом ГБО способствует нормализации структурного состояния мембран.

Оценка интенсивности апоптоза лимфоцитов по регистрации фосфатидилсерина (ФС) во внешнем монослое мембран лимфоцитов с помощью FITC-меченого аннексина-V свидетельствует, что при ОС резко увеличивается количество клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза (+110 %). Применение SkQ1 приводит к нормализации количества апоптотических клеток при ОС. Причем, повышению интенсивности апоптоза лимфоцитов при ОС соответствует увеличение транскрипционной активности гена эффекторной каспазы – *CASP3*, тогда как применение SkQ1 способствует сохранению стационарного уровня экспрессии гена *CASP3* в условиях ОС.

Таким образом, защитный эффект SkQ1 при ГБО-индуцированном окислительном стрессе характеризуется снижением уровня свободнорадикального окисления, нормализацией структурного состояния мембран лимфоцитов, интенсивности апоптоза лимфоцитов и транскрипционной активности гена эффекторной каспазы-3 в лейкоцитах крови крыс.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Базовая часть госзадания № 213.01-11/2014-32).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ МТТ НА МИТОХОНДРИИ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И КОГЕРЕНТНОЙ (ДИНАМИЧЕСКОЙ) ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ТИМОЦИТАХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ

Study of the MTT effect on mitochondrial potential by fluorescence and coherent (dynamic) phase microscopy in thymocytes and cultured neurons

Вышенская Т.В.1, Лисина О.Ю.1,2, Болотова А.А.1, Красильникова И.А.3, Пинелис В.Г.3, Кретушев А.В.1, Горбачева Л.Р.4, Сурин А.М.2,3,4

1 – Московский государственный университет информационных технологий, радиотехники и электроники, 119454, Москва, пр-кт Вернадского, 78

2 – ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, Балтийская ул., 8

3 – ФГБНУ Научный Центр здоровья детей МЗ РФ, 119991, Москва, Ломоносовский пр., 2 стр.1

4 – ГБОУ ВПО РНИМУ им.Н.И.Пирогова, 117513, Москва, ул.Островитянова, 1

e-mail: surin_am@mail.ru

МТТ-анализ относится к числу наиболее используемых методов определения выживаемости клеток при различных токсических воздействиях. Метод основан на том, что внутриклеточные дегидрогеназы живых клеток восстанавливают МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до формазана, который сильно поглощает в широком диапазоне видимого спектра. Формазан образует агрегаты, т.к. плохо растворим в водной среде и поэтому в проходящем свете обнаруживается в клетках по появлению темных «зерен». В работе методами флуоресцентной и когерентной (динамической) фазовой микроскопии исследовали влияние МТТ на митохондрии в тимоцитах и культивируемых нейронах мозжечка крысы. Изменения митохондриального потенциала регистрировали с помощью флуоресцентных зондов Rh123 и TMRM. Добавление МТТ (0,5-0,05 мг/мл) вызывало быстрое тушение флуоресценции зондов. Тушение сменялось через 5-10 мин ростом флуоресценции особенно заметным для Rh123 в области ядра, свидетельствуя о прекращении самотушения в результате выхода зондов из митохондрий и распределения по клетке. Рост сигнала зондов совпадал с началом снижения интенсивности проходящего света (>610 нм) в результате его поглощения образующимся формазаном. Вероятно, восходящая фаза сигнала Rh123 отражает «переключение» цикла Кребса с восстановления NAD^+ до NADH на восстановление МТТ до формазана, в результате чего тормозится работа комплекса 1 дыхательной цепи и снижается митохондриальный потенциал. Изменения фазовых параметров (фазовая высота, площадь, фазовый объем, рефрактерность) в областях ядра, ядрышка, «плотной» цитоплазмы, окружающей ядро, и «тонкой» цитоплазмы по границам клеток показали наибольшее соответствие с изменениями флуоресцентных сигналов Rh123 и TMRM в области «плотной» цитоплазмы клеток, которая максимально насыщена митохондриями. Данные свидетельствуют, что сочетание фазовой микроскопии, не требующей нагрузки клеток зондами, и флуоресцентной микроскопии, использующей специфические зонды, позволяет получить более надежную информацию о расположении органелл в клетках.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 13-02-00278 и 15-04-07885, и гранта Мин.Обр.Науки.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННОЙ ДИНАМИКИ О-АНТИГЕНА НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ**Modeling of the lipopolysaccharide O-antigen conformational dynamics on the bacterial surface**

Галочкина Т. В.1,2, Зленко Д. В.2, Коваленко И. Б.1,2, Нестеренко А. М.2,3

1 – ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Ореховый б-р, 28

2 – Кафедра биофизики, биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1 стр. 24

3 – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный факультет имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1

Тел.: +7(495)939-11-16; факс: +7(495)939-11-16; e-mail: tat.galochkina@gmail.com

Наружная мембрана клеточной стенки грам-отрицательной бактерии представляет собой асимметричный бислои, защищающий бактерию от различных внешних воздействий. Основным компонентом внешнего монослоя мембраны являются молекулы липополисахаридов (ЛПС). ЛПС обладают крайне вариабельной химической структурой и состоят из трех основных частей: липид А, центральный олигосахарид и О-антиген. О-антиген – самая вариабельная, дистальная часть молекулы ЛПС, которая покрывает поверхность грам-отрицательных бактерий и формирует защитный барьер, препятствующий проникновению антимикробных агентов к гидрофобному бислою. Из-за высокого структурного разнообразия и большой молекулярной массы не существует прямых экспериментальных данных, точно описывающих пространственную укладку О-антигенов на поверхности бактериальной клетки. В нашей работе мы проводим детальный анализ конформационной подвижности О-антигена с помощью методов молекулярно-динамического (МД) моделирования.

Нами была разработана МД модель молекулы ЛПС на базе силового поля OPLS-AA [1], а также модель фрагмента клеточной мембраны грам-отрицательной бактерии, состоящая из 20 полных молекул ЛПС во внешнем монослое, 20 молекул ЛПС без О-антигена во внутреннем монослое и 8 интегральных белков. Построенные модели были использованы для продолжительных МД расчетов с использованием пакета программ GROMACS [2], по результатам которых был проведен анализ конформационной подвижности О-антигенной части молекул ЛПС. В качестве стартовой конформации О-антигенной цепи мы использовали спиральную структуру, опираясь на экспериментальные данные для олигосахаридов в растворе и особенности их биосинтеза. В процессе МД расчетов модельной мембраны мы проследили процесс термического разрушения изначальной спиральной структуры О-антигена. Было показано, что полная реорганизация О-антигенов в мембране происходит за счет изменения всего нескольких степеней свободы. Так, меняется конформация одного из углеводных остатков (маннозы), а также происходит поворот вокруг всего одной О-гликозидной связи. В результате образуется ранее не наблюдавшийся в расчётах [3] неоднородный примембранный слой, состоящий из запутанных цепочек О-антигена, формирующих заполненные водой полости над интегральными белками. Этот гетерогенный слой должен существенно замедлять диффузию в околосмембранном пространстве и может иметь адаптивное значение для бактерии.

1. Jorgensen, W.L., et al., Journal of the American Chemical Society, 1996, vol. 118, pp. 11225-36.
2. Hess, B., et al., Journal of Chemical Theory and Computation, 2008, vol. 4, pp. 435-447.
3. Wu, E.L., et al., Biophysical journal, 2013, vol. 105, pp. 1444-55.

ЛАБИЛЬНЫЙ ЦИНК УЧАСТВУЕТ В РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

The labile zinc takes part in the development of oxidative stress in human erythrocytes

Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Канах Ю.С., Зубрицкая Г.П., Кутько А.Г., Слобожанина Е.И.
ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”, 220072, Минск, ул. Академическая, 27
e-mail: garmaza@yandex.ru

Цель работы – выяснение роли внутриклеточного лабильного цинка в развитии H₂O₂-индуцированного окислительного стресса и процессов клеточной гибели в эритроцитах человека.

Материалы и методы: В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров. Изменение внутриклеточной концентрации лабильных ионов цинка определяли с использованием флуоресцентного зонда FluoZin-3-AM (Molecular Probes). Оценку внутриклеточной эстеразной активности проводили с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-AM (Sigma). Окислительно-восстановительный статус эритроцитов человека оценивали по измерению активности основных ферментов антиоксидантной защиты клеток (каталазы и глутатионпероксидазы). Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически по методу Элмана. Исследования были выполнены на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickenson) в FITC-H канале и на спектрофотометре (Specord).

Результаты и обсуждение: Показано, что воздействие пероксида водорода в концентрациях 30–1000 мкМ на эритроциты человека *in vitro* приводит к статистически достоверному дозозависимому увеличению внутриклеточного пула Zn²⁺ и ингибированию цитозольной эстеразной активности – основного маркера жизнеспособности клеток, причем полученный эффект зависит от времени инкубации с H₂O₂. Выявлена обратная зависимость между изменением внутриклеточного уровня лабильных ионов цинка и цитозольной эстеразной активности эритроцитов человека, подвергшихся воздействию H₂O₂, что свидетельствует о роли Zn²⁺ в активации процесса запрограммированной гибели эритроцитов.

Впервые продемонстрировано, что сочетанное действие пероксида водорода и внутриклеточного хелатора ионов цинка N',N'-тетраakis-(2-пиридил-метил)-этилендиамина (TPEN) снимает цитотоксичный эффект H₂O₂, а добавление Zn²⁺ в среду инкубации эритроцитов с пероксидом водорода приводит к усилению его эффекта. Это позволяет предположить, что одной из причин, приводящих к H₂O₂-индуцированному увеличению внутриклеточного уровня Zn²⁺, может выступать высвобождение данного иона из его внутриклеточных депо или связывающих сайтов. Более того, выявлена связь между содержанием клеточных тиолов и уровнем внутриклеточного лабильного цинка. Предположено, что одним из механизмов, приводящим к высвобождению Zn²⁺ из внутриклеточных связывающих сайтов в результате H₂O₂-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах человека, может являться уменьшение содержания небелковых тиольных групп за счет снижения уровня восстановленного глутатиона.

ИНТЕРНОДАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ CHARA FRAGILIS – НОВЫЙ ОБЪЕКТ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гасанова А.Э.1, Наджафалиева Ш.А.1, Рагимова С.Н.2, Мусаев Н.А.1

1 – Бакинский Государственный Университет

2 – Азербайджанский Государственный Аграрный Университет

e-mail: ahasanova89@gmail.com

Основные требования, предъявляемые к объектам исследования при проведении измерений электрофизиологических параметров, не нарушая интактность исследуемой клетки – это их крупные размеры, прозрачность, чёткая дифференциация структурных фаз. Такими характеристиками обладают интернодальные клетки растений *Chara fragilis*. Растение *Chara fragilis*, являющееся одним из видов семейства *Characeae* обнаружено нами в небольшом водоёме Товузского района Азербайджанской Республики “Катиб булагы”. Минеральный состав воды “Катиб булагы”, соответствовал составу искусственной прудовой воды (ИПВ), содержанием $0,1\text{M K}^+$, 1M Na^+ , $0,4\text{M Ca}^{2+}$, $0,3\text{M Mg}^{2+}$ и анионов Cl^- , HCO_3^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . Поэтому выращивание растений в лабораторных условиях осуществили в аквариумах параллелепипедной формы, заполненными ИПВ. Длина интернодальных клеток оказались в пределах 1- 5 см, а диаметр- 0,4-0,7 мм.

В качестве электрофизиологических параметров клеток *Chara fragilis* нами были измерены потенциал ϕ_m и сопротивление r_m плазматической мембраны. Измерение параметров ϕ_m , r_m осуществили двухэлектродным методом Хогга с привлечением стеклянных микроэлектродов. ϕ_m , r_m тонопласта оказались незначительными.

Разброс значений мембранного потенциала ϕ_m в стандартных условиях среды находился в пределах $-105 \div -300$ мВ (число клеток 80) со средним значением $\bar{\phi}_m = -190 \pm 6$ мВ. Установлена эмпирическая зависимость распределения ϕ_m по числам клеток. Полученная теоретическая зависимость с помощью вариационной статистики показала, что распределение ϕ_m по числам клеток уровнем значимости 5% следует отнести к нормальному распределению. Мембранное сопротивление r_m варьировало в пределах 6,5-36,5 Ом·м². Среднее значение r_m составляло $12,8 \pm 2,4$ Ом·м².

Для клеток *Chara fragilis* были характерны высокая электрогенная активность, достигавшая не редко -300 мВ, и необычайно высокое мембранное сопротивление, превышающее r_m других видов харофитов на один порядок. При этом мембрана выдерживает градиент электрохимического потенциала 30 кДж/моль. Для того, чтобы выдерживать градиент электрохимических потенциалов такой значительной величины необходимым условием является наличие r_m достаточно большой величины, которое зарегистрировано нами.

Зависимость электрофизиологических параметров клеток *Chara fragilis* от внешней концентрации ионов K^+ определялась уровнем ϕ_m в ИПВ. Для клеток с $\phi_m \sim -250$ мВ мы наблюдали слабую зависимость параметров ϕ_m , r_m от внешней концентрации K^+ . Плазматическая мембрана клеток с $\phi_m \sim -170$ мВ на увеличение внешней концентрации K^+ реагировала как K^+ -электрод. По этой зависимости мы определяли K^+ - равновесный потенциал клеток *Chara fragilis* ϕ_k , что составлял 169 ± 2 мВ.

Клетки *Chara fragilis* могут выступить новым объектом исследования для: установления мембранных механизмов переноса веществ, скрининга механизмов мембранотропных действии физиологически активных веществ, в том числе экологических факторов, ксенобиотиков, радиопротекторов и других фармакологических агентов.

ОСОБЕННОСТИ ФИКСАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Specifics of erythrocyte fixing for atomic force microscopy

Демченков Е. Л., Будкевич Р.О.

Северо-Кавказский федеральный университет, 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1;

e-mail: rbudkevich@ncfu.ru

Атомно-силовой сканирующий микроскоп (АСМ) был создан для нужд материаловедения [1] и не предполагал использования для биологических исследований, поэтому сканирование клеток является одним из наиболее сложных и неоднозначных применений АСМ в биологии. При сканировании животных клеток возникает ряд трудностей, связанных с мягкостью объектов и их большим размером при малом поле сканирования, сильным перепадом высот на образце. Эритроциты стали одним из первых клеточных объектов, визуализированных с применением АСМ [2], они до сих пор остаются сложным объектом для данного метода. На сегодняшний день нет единого мнения в оптимальном методе приготовления эритроцитов для их исследования АСМ. В работе [3] было показано, что в зависимости от способа сушки и фиксации теней эритроцитов мембрана претерпевает серьезные изменения. С учетом малых размеров поля сканирования АСМ, имеет значение однородность нанесенного слоя эритроцитов. Большинство исследований эритроцитов проводят после их высушивания на воздухе, что приводит к нарушению морфологии клетки.

Целью исследования был анализ методов подготовки эритроцитов и разработки надежного протокола подготовки проб эритроцитов для их изучения методами АСМ.

Эксперименты проведены на эритроцитах крыс линии Вистар. Для сканирования использовали АСМ NtegraSpectra (NT-MDT, Россия). В серии экспериментов рассмотрены варианты нанесения эритроцитов на подложку: простой мазок, сдувание капли суспензии эритроцитов струей воздуха, создание монослоя путем центрифугирования, различные варианты осаждения эритроцитов из суспензии.

Было показано, что оптимальным методом, не изменяющим форму эритроцитов, является их осаждение из суспензии на покровные стекла, которые были предварительно обработанным 1% глутаровым альдегидом. Выявлено улучшение гомогенности получаемого слоя при осаждении эритроцитов на стекло с применением шейкера-термостата. В проведенных исследованиях по созданию раствора для фиксации эритроцитов оптимальным было применение 2,5 % глутарового альдегида, приготовленного на 20 мМ Нерес буфере и растворе Рингера-Локка. Глутаровый альдегид снижает pH и оказывает существенное воздействие на эритроциты. Без применения буфера и солевого раствора при фиксации, образуется большое число эритроцитов искажённой формы, поскольку фиксация происходит не мгновенно.

Таким образом, анализ литературы и экспериментальные данные указывают на методологические сложности в использовании эритроцитов для АСМ, что можно избежать при аналитическом подборе метода фиксации.

Работа выполнена при поддержке гранта «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

1. Binnig, G. and Quate, C.F., Physical review letters, 1985, vol. 56, no. 9, pp. 930-931.
2. Gould, S.A.C., et al., Journal of Vacuum Science & Technology A, 1990, vol. 8, pp. 369-373.
3. Minoru, T., et al., Biophysical Journal, 1998, vol. 74, no. 5, pp. 2171-2183.

АНАЛИЗ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ КЛЕТОК, ВКЛЮЧАЮЩИХ В СЕБЯ КАЛЬЦИЙ И ЦИКЛИЧЕСКИЕ МОНОФОСФАТЫ**Analysis of cell signaling systems that include calcium and cyclic monophosphate****Евстифеев А.И.¹, Базановас А.Н.¹, Садреев И.И.², Котов Н.В.¹**¹ – Казанский (Приволжский) Федеральный Университет. 420008, КАЗАНЬ, РОССИЯ² – Университет Эксетер. EXETER EX4 4QF, АНГЛИЯ.Тел. 89179359702, e-mail nvkotov@gmail.com

Кальций-кальмодулин зависимые сигнальные системы, управляющие активностью клеток, одни из древнейших сигнальных систем. Они есть у всех клеток эукариот (животных, грибов, растений). Функционально эти сигнальные системы входят в контуры управления сложными и простыми типами поведения клеток (двигательного, пролиферативного, социального и т. д.).

Мы проанализировали модуль, в который входят кальций-кальмодулин зависимые элементы: аденилатциклазы, гуанилатциклазы, фосфодиэстеразы, NO синтазы, протеинкиназы, фосфопроteinфосфатазы, потенциал зависимые кальциевые каналы, каналы активного транспорта кальция и каналы, проводимость которых модулируется циклическими монофосфатами.

Анализ проводился с помощью построенной нами математической модели. Найдены особые точки и построены фазовые портреты этой модели при разных морфологических составах и разных значениях параметров. При этом, в общем случае у такого модуля могут быть до пяти (5, 3, 1) особых точек, часть из которых могут быть устойчивые.

Также нами исследовалась динамика этих сигнальных систем при подаче на вход внешних воздействий. Показано, что на перечисленных выше элементах могут быть построены генераторы, мультивибраторы, переключатели. Причем эти переключатели могут работать в разных режимах. Например, в режиме Т – триггера (3 особые точки), когда первый кальциевый импульс переключает из одной устойчивой особой точки в другую, а второй, с такими же параметрами, как и первый, переключает обратно в исходное состояние.

Мы сопоставили теоретический анализ, проведенный нами, с экспериментальными результатами по исследованию поведения *Paramecium caudatum*, *Spirostomum ambiguum* [2] и триггерного изменения концентрации кальция в эритроцитах *Homo sapiens* [1, 3] под действием лизофосфатидной кислоты, у которых кальций и циклические монофосфаты являются базовыми элементами их сигнальных систем. Получено хорошее качественное совпадение теоретических расчетов и экспериментальных результатов.

1. Bazanovas, A.N., Evstifeev, A.I., Khaiboullina, S.F., Sadreev, I.I., Skorinkin, A.I., and Kotov, N.V., Erythrocyte: A systems model of the control of aggregation and deformability, *Biosystems*, 2015, vol. 131, pp. 1-8.
Valeyev, N.V., Bates, D.G., Umezawa, Y., Gizatullina, A.N., and Kotov, M.N., *Systems biology of cell behavior*, *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 662, pp. 79-95.

2. Wang, J., Wagner-Britz, L., Bogdanova, A., Ruppenthal, S., Wiesen, K., Kaiser, E., Tian, Q., Krause, E., Bernhardt, I., Lipp, P., Philipp, S.E., and Kaestner, L., Morphologically homogeneous red blood cells present a heterogeneous response to hormonal stimulation, *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 6, p. e67697.

МНОГОКОМПОНЕНТНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРЕНОСА АМИНОКИСЛОТЫ ГЛИЦИН ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ НЕЙРОНОВ- НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

The multicomponent regulation of transport amino acid glycine across the membrane of neurons – the prospect of creating new drugs

Зайцев К.С.1, Бороновский С.Е.1, Нарциссов Я.Р.1

1 – НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14

Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail: icmph@yandex.ru

Глицин (аминоуксусная кислота) является одним из основных ингибирующих нейромедиаторов центральной нервной системы (ЦНС) и является одним из наиболее распространенных компонентов белков. Ингибирующая функция, состоящая в активации специфических лиганд-зависимых хлорных каналов, представляет собой важнейший аспект работы нервной системы млекопитающих. Поскольку передача торможения между нейронами, организованная в виде специализированных синапсов, подразумевает возобновление пула нейромедиаторов, то мембранные транспортные системы играют существенную роль в регуляции активности как отдельных нейронов, так и всей нервной ткани в целом. К таким транспортным системам относятся специфические переносчики глицина в глиальные (GLYT1) и в нейрональные (GLYT2) клетки. Механизм, с помощью которого белки-переносчики осуществляют захват аминокислоты, включает также связывание и котранспорт ионов Na^+ (2 иона для переносчика GLYT1 и 3 для GLYT2) и иона Cl^- . Целью данной работы является разработка симулятора функционирования мембранного переносчика аминокислоты. На основе имеющихся литературных данных сконструирована схема работы GLYT2, по которой был составлен вероятностный механизм последовательности событий в ходе полного цикла конформационных изменений транспортера. Предложенный алгоритм был реализован в виде программного обеспечения Glycine Transporter (GT), которое позволяет моделировать единичный переносчик в зависимости от различных внешних (например, концентрации метаболитов в среде) и внутренних (характеристики конформационных переходов фермента) параметров. С помощью GT было изучено поведение системы в широком диапазоне константы равновесия (от 0.2 до 100), которая не определена экспериментально. Показано существенное влияние K_{eq} в диапазоне от 0.2 до 10 на процесс переноса глицина, при значениях константы вне указанного диапазона определяющими являются другие характеристики системы. GT позволяет получать величины потоков котранспортных ионов и глицина как в численном, так и в графическом виде. Сходство функциональных механизмов GLYT2 и GLYT1, а также гибкость представленного программного обеспечения позволяет расширить область применения разработанного алгоритма для полного описания транспорта глицина в нервных клетках.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ КИСЛОРОДА**Permeability of the lipid membranes for oxygen*****Иванов И.И., Локтюшкин А.В., Гуськова Р.А., Васильев Н.С., Рубин А.Б.***

Кафедра биофизики биофак МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12

Тел.: +7(495) 939-1116, факс +7(495) 939-1115; e-mail: ivanov36@mail.ru

Пересекая клеточные мембраны частицы, в том числе кислород, преодолевают пять основных энергетических и диффузионных барьеров: два барьера, снижающих концентрацию переносимых частиц в водных фазах с двух сторон мембраны, обусловленные появлением непременных слоев. Два барьера на входе и выходе из собственно мембраны, обусловленные энергией дегидратации переносимых зарядов и силами дипольных взаимодействий, возникающих при изменении дипольного момента среды. И, наконец, барьер, обусловленный диффузионным сопротивлением непосредственно углеводородной зоны мембраны. Важную роль в проницаемости и распределении суммарного градиента концентрации транспортируемой частицы по последовательным элементам в мембране играет коэффициент распределения транспортируемой частицы между углеводородной фазой мембраны и водой. Для молекулярного кислорода, коэффициент распределения которого близок к единице, все падение трансмембранного концентрационного градиента кислорода происходит внутри липидного бислоя; другие энергетические барьеры не играют существенной роли. И, наоборот, для частиц с коэффициентом распределения более чем на полтора порядка отличающимся от единицы (в одну или другую сторону), вклад диффузионного сопротивления углеводородной зоны мембран пренебрежимо мал по сравнению с общим трансмембранным сопротивлением. Соответственно небольшие изменения диффузионного сопротивления при изменении состава мембран или при внешних воздействиях на трансмембранный транспорт фактически невозможно ни измерить, ни учесть. Таким образом, кислород не только ключевой элемент аэробной жизни, но и молекула-зонд, проницаемость которой через мембрану определяется в основном диффузионным сопротивлением углеводородной зоны её липидного бислоя. В литературе существуют разные точки зрения относительно природы и величины коэффициента проницаемости липидного слоя для кислорода; от простой диффузии, до облегченной через белковые поры-каналы (например, аквапорин 1 эритроцитов). Гипотезу каналов поддерживают результаты, свидетельствующие, что многие другие небольшие частицы пересекают мембраны через каналы белковых пор. В связи с этим, мы исследовали с помощью метода остановленного потока влияние ртутных ингибиторов аквапорина 1 на транспорт кислорода и воды через мембраны эритроцитов человека. Установлено, что $HgCl_2$ концентрационно зависимо ингибирует как транспорт кислорода, так и транспорт воды через мембраны. В то же время другой ртутный ингибитор пХМБ тормозил транспорт воды, но практически не влияет на транспорт кислорода. Эти и ряд других фактов побудили нас исследовать петушиные эритроциты, мембраны которых не содержат аквапоринов. Действительно, в отсутствие аквапоринов в мембранах, использованные в работе ртутные ингибиторы не оказывали ингибирующего действия на транспорт воды. При этом ингибирующее действие $HgCl_2$ на кислородный транспорт куриных эритроцитов не отличалось от человеческих. Это может означать, что ингибирование кислородного транспорта – не результат блокирования белковых каналов, а следствие образования многокомпонентных комплексов заряженных головок фосфолипидов мембран и двухвалентных катионов ртути. Появление этих комплексов уменьшает подвижность липидов мембран и тормозит скорость трансмембранной диффузии кислорода. Подчеркнем, что эту регуляцию диффузионных свойств липидного слоя мембран трудно обнаружить и измерить, не используя кислород в качестве переносимой частицы.

ДЕЙСТВИЕ ГИДРОЛИЗУЕМОГО ТАНИНА НА НАТИВНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Effect of Hydrolyzable Tannins on Native and Artificial Biological Membranes

Катаев А.А.1, Борисова М.П.2

1 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, Моск. обл., ул. Институтская 3

2 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, Моск. обл., ул. Институтская 3

e-mail: aakka@rambler.ru

Изучено действие гидролизуемого танина на плазматическую мембрану гигантской клетки водоросли *Chara corallina* и на искусственную бислойную липидную мембрану (БЛМ). Обнаружено дозозависимое блокирование хлорных каналов танином в мембране водоросли. Концентрация, при которой достигалось 50% блокирование $C_{50} = 3.35 \pm 0.04$ мкг/мл. Коэффициент Хилла, характеризующий кооперативность взаимодействия соединения и соответствующих мишеней, равен $n = 1.87 \pm 0.03$, что говорит о положительной кооперативности при взаимодействии молекул танина с белком, образующим хлорный канал. Показано, что в присутствии гидролизуемого танина в БЛМ возникают скачки тока, которые свидетельствуют об образовании ионных каналов. Наличие холестерина в составе БЛМ увеличивает время жизни канала в открытом состоянии. Каналы имеют анионную селективность. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидролизуемые танины являются мембраноактивными веществами, которые образуют в клеточной мембране анионные каналы.

В нашей работе исследуется вещество, относящееся к группе гидролизуемых танинов. Впервые сравниваются факты, полученные на нативной мембране (*in vivo*) и на БЛМ (*in vitro*) для одного вещества, которые показывают:

Гидролизуемый танин проникает в гидрофобную область мембраны клетки *Chara corallina*, модифицирует ее, что видно из возникновения и роста тока утечки с увеличением концентрации танина.

Эксперименты на искусственной липидной мембране показали образование ионных каналов в липидном бислое.

Опыты с отмывкой и изменение тока утечки показали, что танин флуктуирует между поверхностью и гидрофобной областью клеточной мембраны. Мы предполагаем, что в гидрофобной области танин находится в виде отдельных молекул и в молекулярном комплексе, образующим ионный канал. Отдельные молекулы могут диффундировать на поверхность мембраны и вновь связываться с белком, образующим хлорный канал (TMEM16A).

Ионные каналы, образованные танином состоят из разного числа мономеров, что соответствует разным уровням проводимости на БЛМ при одном напряжении. Кратность значения проводимости одной и той же величине (6.1 pS) при различных напряжениях также соответствует такому предположению.

Понимание этих фактов является предпосылкой для создания веществ с заданными свойствами. Так, более надёжными протекторами мембран будут вещества менее гидрофобные, имеющие заряженные группы, позволяющие в полной мере использовать электростатический эффект и при этом блокировать поверхностные мембранные белки. Это должно привести к уменьшению действующей концентрации и более быстрому выведению агента из организма. Более гидрофобные формы танина будут обладать более выраженным мочегонным эффектом.

ПОВЫШЕНИЕ БИОДОСТУПНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЬ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩИХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ**Increasing the bioavailability of chemotherapeutic drugs into the tumor using magnetic scanning fields**

Кут О.И., Шихлярова А.И., Максимов А.Ю., Шевченко А.В., Филатова Е.В., Тарнопольска О.В., Куркина Т.А.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, 344037 г. Ростов-на-Дону 14 линия 63.
e-mail rnioi@list.ru

В разных видах опухолей животных и человека регистрируются сигналы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), что указывает на их осцилляторную активность. Нарушение биологического частотного контура опухоли с помощью специальных сканирующих электромагнитных возмущений может повлечь изменение, прежде всего, мембранного потенциала (МП) опухолевых клеток, что может повысить проницаемость мембраны к химиопрепаратам. Целью работы явилось изучение биодоступности препаратов платины (Pt) в клетки саркомы 45 под воздействием сканирующего магнитного поля (СК МП). В опытах *in vitro* использовали методики под капсульного введения в выделенную опухоль Pt с одновременным воздействием СК МП. В последующем определяли проницаемость мембран флуоресцентными потенциалзависимыми зондами – анион АНС (1-анилинафталин-8-сульфонат) и катион ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил) -метилпиридиний). Исследования осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа «Axiom ager.M2», Zeiss, цифровой камеры Axio Cam HR, а измерения параметров проводили, используя программное приложение Axio Vision, rel.4.8. В каждой пробе (*n*=10) измеряли от 100 до 500 живых клеток С-45 и анализировали яркость флуоресценции по АНС и ДСМ с максимумом и минимумом свечения, а также площадь клетки и ядра. При интерактивных измерениях регистрировали аналогичные параметры лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. Учитывали, что противоионы АНС и ДСМ действуют противоположно: уменьшение яркости по АНС свидетельствует о возрастании мембранного потенциала, а повышение яркости по ДСМ прямо пропорционально его увеличению. Визуализация контрольных препаратов показала, что клетки саркомы 45 с воздействием Pt без СК МП при витальной флуориметрии характеризовались слабым неинтенсивным свечением. В части клеток определялся светлый контур ядерной мембраны, ядрышки и глыбки хроматина, а также цитоплазма клеток практически не флуоресцировала. Воздействие на опухоль СК МП увеличивало мембранный потенциал живых клеток в среднем на 80% и гиперполяризовало их. Применяемый режим СК МП являлся надпороговым воздействием и эффект гиперполяризации воспроизводился в 100% проведенных опытов. Под влиянием этого физического фактора значительно усиливалась флуоресценция, достоверно (практически в 2 раза) возрастала яркость свечения опухолевых клеток, что отражало высокую проницаемость мембраны для цитостатика. Снижался уровень их жизнеспособности, что отразилось на морфологических признаках влияния химиопрепарата: доминирование разрушенных клеток над целыми, резко выраженная вакуолизация цитоплазмы, разбухание ядра. Таким образом, трансляция сканирующего сигнала для повышения биодоступности лекарственных агентов в ткань опухоли представляет собой реальные перспективы повышения эффективности противоопухолевого лечения.

ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КЛЕТКИ И НОВЫЕ ЗНАЧИМЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

Клемяшов И.В.

Московский государственный университет информационных технологий, радиотехники и электроники, 119454, Москва, пр-т Вернадского, 78
Тел.: +7(499)434-67-92; e-mail: iv_klem@mail.ru

Параметр ЯЦО(S) широко используется в цитометрии. На основании проведенного моделирования двухкомпонентной модели клетки и полученных новых значимых оптических параметров можно предложить новую методику диагностики для случаев нормы и различных патологий (в т.ч. рак). В качестве контроля были использованы фиксированные 4% р-ром формалина Т-лимфоциты человека. Ранее было показано (1), что типичное изображение Т-лимфоцита, полученное и посчитанное по стандартной методике на микроскопе Zeiss LSM 710 дало значение ЯЦО(S) - 1,58. Это значение соответствует значению математического моделирования в среде Scilab по двухкомпонентной модели клетки и полученному методом когерентной фазовой микроскопии (КФМ) на живых неокрашенных Т-лимфоцитах - площадь ядра $S_{\text{я}} \approx 30 \text{ мкм}^2$, площадь цитоплазмы $S_{\text{ц}} \approx 18 \text{ мкм}^2$, ЯЦО(S) $\approx 1,60$. На топогистограмме рефрактерности в модели имеется контрастный пик соответствующий границе ядро-цитоплазма. Эта характерная точка позволяет определить интегральные значения показателей преломления ($n^{\text{инт}}$) и фазовых объемов ($^{\phi}W$) ядра и цитоплазмы как фиксированных, так и живых клеток: $n^{\text{инт}}(\text{я})=1,355$, $^{\phi}W_{\text{я}} \approx 7,5 \text{ мкм}^3$; $n^{\text{инт}}(\text{ц})=1,377$, $^{\phi}W_{\text{ц}} \approx 1,7 \text{ мкм}^3$, фазовый объем всей клетки $^{\phi}W \approx 9,2 \text{ мкм}^3$ в сферическом приближении. Из литературы известно (Барер и др.) что интегральные значения $n^{\text{инт}}(\text{я})$ и $n^{\text{инт}}(\text{ц})$ здоровой клетки соответствуют значениям полученным методом КФМ. Находим ЯЦО($^{\phi}W$) $\approx 4,4$ для двухкомпонентной сферической модели нормального Т-лимфоцита. Параметр ЯЦО($^{\phi}W$) является новым значимым параметром характеризующим отношение интегральных значений фазовых объемов, зависящих от объемов и показателей преломления ядра и цитоплазмы клетки. Фазовый объем ядра лимфоцита в норме $^{\phi}W_{\text{я}} \approx 7,5 \text{ мкм}^3$ так же является важным значимым параметром. В случае патологии (рак) известно, что интегральное значение показателя преломления ядра выше, чем в норме и лежит в диапазоне 1,39-1,40. Методом КФМ получены значения $n^{\text{инт}}(\text{я}) = 1,391$, $^{\phi}W_{\text{я}} \approx 217,8 \text{ мкм}^3$ для раковой клетки человека. Относительный коэффициент к норме для $^{\text{отн-}\phi}W_{\text{я}} = ^{\phi}W(\text{я}^{\text{пат}})/^{\phi}W(\text{я}^{\text{норм}}) - 29$.

1. Клемяшов И.В., Матвеев Ю.Б., Вышенская Т.В., Кузнецов А.Б., Звержховский В.Д., Тычинский В.П. «Фазовые параметры одиночной фиксированной в формалине клетки», ТКМФ-6, 591-592, 2014.

ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЛАДКИХ МЫШЦ**Ionic mechanisms of the influence of gasotransmitters on the electric and contractile properties of smooth muscles**

Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Носарев А.В., Медведев М.А., Орлов С.Н.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, 634050, Томск, Московский тр., 2

Тел.: 8(3822)901-101; e-mail: kovalew@mail.ru

В настоящее время мало кем отрицается основная роль ионов кальция и циклических нуклеотидов в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток (ГМК). Тем не менее, степень и направленность влияния различных модуляторов сократительных свойств ГМК остаются предметом активных исследований, так как могут лежать в основе миогенных расстройств гладкомышечной ткани. Среди них особую группу составляют газы: NO, H₂S, CO [1,2]. Многие физиологические и патологические процессы зависят от уровня содержания их в плазме крови, что заставляет изучать эти газотрансмиттеры не только как сигнальное звено патогенеза, но и как перспективное направление в фармакотерапии. Однако, существующая разнонаправленность действия газовых трансмиттеров на клетки, включая ГМК [3], может объясняться не только особенностью их собственного влияния, но и/или вовлечением в оперирование других внутриклеточных сигнальных и эффекторных систем.

Методом двойного сахарозного моста и механографии изучалось влияние доноров газотрансмиттеров (NO—нитропруссид натрия, H₂S—NaHS и CO—CORM-II) на электрическую и сократительную активность ГМК. Использование активаторов и ингибиторов сигнальных путей позволило модулировать активность кальциевой сигнальной системы и уровень циклических нуклеотидов в гладкомышечных клетках. Механизмы влияния газомедиаторов на ион-транспортные системы исследовали с помощью блокаторов калиевой проводимости мембраны, ингибиторов натрий-зависимых ионообменных систем и модифицированных по ионному составу растворов.

Показано, что активаторы рецепторуправляемого входа кальция в клетку (фенилэфрин и гистамин), усиливали релаксирующее влияние газотрансмиттеров на ГМК. Угнетение процессов, сопряженных с калиевой и, особенно, с натриевой проводимостью мембраны, наоборот, ослабляло миогенные эффекты исследуемых газов. Влияние уровня циклических нуклеотидов на степень и направленность влияния газотрансмиттеров на сокращение гладких мышц, позволяет считать цАМФ- и цГМФ-зависимую калиевую проводимость мембран их непосредственной мишенью. Применение безнатриевого раствора, ингибиторов Na⁺/H⁺-обмена и Na⁺,K⁺,2Cl⁻-котранспорта изменяло направленность сократительных ответов (для NO, CO), либо практически их отменяло (H₂S).

Таким образом, эффекторными мишенями воздействия газомедиаторов на сократительную активность ГМК могут быть их натрий-зависимые ионообменные системы.

1. Баскаков, М.Б. и Юсубов, М.С., Газовая атака или Осторожно, газы, Бюл. сиб. медицины, 2010, т. 9, №6, сс. 160-164.
 2. Ковалев, И.В., Гусакова, С.В., Бирулина, Ю.Г. и др., Роль газовых посредников в регуляции функций гладких мышц: вероятные эффекторные системы, Бюл. сиб. медицины, 2014, т. 13, №6, сс. 139-145.
- Wang, R., Gasotransmitters: growing pains and joys, Trends Biochem. Sci., 2014, vol. 39, no. 5, pp. 227-232. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.03.003.

ЗАРЯЖЕННЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА (ПАВ) КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ ГРАНИЧНОГО МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Charged surfactants as effective modifiers of the boundary of the membrane potential

Ковалева А. А. 2, Корепанова Е. А.1, Антонов В. Ф.1

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.И. Сеченова, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Тел.:+7(499)-367-18-72;e-mail:koreevgeniya@yandex.ru

2 – ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Тел.:+7(926)-678-09-74;e-mail:nastasiakowalewa@yandex.ru

Плазматическая мембрана, благодаря барьерным свойствам и присутствующим в ней транспортным белкам, поддерживает уникальный ионный состав клетки, отличающийся от состава внешней среды, что обеспечивает возможность жизни клетки в неравновесных условиях. Изменение ионной проницаемости мембран относится к ранним ответам клетки на любые воздействия. Адсорбция заряженных амфифильных и поверхностно активных веществ (ПАВ) на границе мембраны может оказывать существенное влияние на величину граничного скачка потенциала, эффективность трансмембранного переноса ионов и структурно функциональное состояние мембраны в целом.

Мы изучали действие ПАВ на плоские модельные липидные мембраны, используя в качестве индикатора изменения барьерно-транспортных свойств мембраны величину её удельной электрической проводимости, обусловленной перемещением ионов под действием электрического поля. В настоящей работе использовался анионный детергент SDS, некоторые заряженные молекулы, обладающие поверхностной активностью: положительно заряженный полимиксин, катионный детергент СТАВ, незаряженный детергент Тритон X-100, анионный флуоресцентный зонд ANS, который в дальнейшем был использован нами для оценки состояния полярной области мембран, модифицированных ПАВ. Судя по эффективным концентрациям наиболее эффективным модификатором мембраны оказался катионный детергент с самой длинной алифатической цепью. Встраивание небольших количеств линейных молекул заряженных ПАВ в липидную мембрану не влияет на структуру полярной и углеводородной фазы мембраны. Однако, граничный электрический потенциал при этом увеличивается или уменьшается в зависимости от знака заряда детергента.

Чтобы снять вопрос о возможном перемещении ионных детергентов через мембрану подобно известным органическим ионам, мы изучили мембранные потенциалы, появляющиеся в условиях трансмембранного градиента SDS, создаваемого невысокими концентрациями детергента, которые мы назвали неэффективными, то есть не оказывающими действия на электропроводность мембраны при их симметричной добавке. Анионы детергента не перемещаются через мембрану, так как регистрируемые потенциалы не равны равновесному потенциалу Нернста. Об этом свидетельствует и тот факт, что регистрируемый на стороне более высокой концентрации аниона потенциал был отрицательным. В отличие от SDS жирорастворимый ионный комплексон валиномицин при наличии градиента калия создает трансмембранную разность граничных потенциалов, совпадающую с расчетной величиной потенциала Нернста.

Таким образом, использование заряженных линейных детергентов с алифатической цепью из 12-16 атомов углерода, приводит к изменению граничного мембранного потенциала, достаточного для мягкой модификации мембраны, и этой модификации достаточно для того, чтобы повысить или уменьшить восприимчивость мембраны к действию тех или иных внешних факторов.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ФАКТОРА X ВНЕШНЕЙ ТЕНАЗОЙ**Mathematical modelling of membrane-dependent factor X activation by extrinsic tenase****Коваленко Т.А.1,2, Пантелеев М.А.1,2,3**

1 – физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – Центр Теоретических Проблем Физико-химической Фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина 4

3 – Федеральный Научно-клинический Центр Детской Гематологии, Онкологии и Иммунологии им. Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д.1

e-mail: after-ten@yandex.ru

Инициация свертывания (процесса, ведущего к переходу крови из жидкого состояния в состояние геля и предотвращающего потерю крови при повреждении сосуда) происходит при контакте плазмы крови с окружающими сосуд тканями. Их клетки содержат трансмембранный белок – тканевый фактор (TF), который образует комплекс (внешнюю теназу) с протеазой плазмы крови фактором VIIa [1]. Основным его субстратом является неактивный фактор X. Он образует с теназой тройной комплекс и активируется ею до протеазы фактора Xa [1,2]. Факторы X и Xa способны присоединяться к отрицательно-заряженной фосфолипидной мембране [3]. В научной литературе ведется дискуссия о преобладающем пути доставки субстрата к теназе – по мембране или из раствора [4,5]. Кроме того, факторы X и Xa способны формировать олигомеры на отрицательно-заряженной мембране [6], и их роль в инициации свертывания не изучена.

Цель: с помощью математического моделирования определить преобладающий путь доставки субстрата к внешней теназе.

Методы: математическая модель представляет собой систему из 17 обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих реакцию инициации свертывания включая оба возможных пути доставки субстрата. Система была решена и исследована в пакете Matlab.

Результаты: решение системы представляло собой зависимости концентраций всех реагирующих веществ от времени. По ним была рассчитана зависимость скорости наработки Xa от времени и зависимость начальной скорости от концентрации липидов $V(\text{lip})$ для всех возможных вариантов подвода субстрата. $V(\text{lip})$ качественно соответствовала эксперименту [4] в случае, если активация свободного X шла хуже, чем связанного. Для этих случаев была рассчитана зависимость начальной скорости от концентрации субстрата $V(X)$ и соответствующая константа Михаэлиса. Наилучшее соответствие эксперименту [2,4] обеспечивалось, когда преобладающим субстратом являлся фактор X с мембраны, а X из раствора активировался как минимум на 3 порядка хуже.

Вывод: преобладающим субстратом внешней теназы является связанный с мембраной фактор X, сделана оценка сверху для второго пути подвода субстрата.

1. Colman, R.W., Clowes, A.W., Goldhaber, S.Z., Marder, V.J., and George, J.N., Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice, 5th ed., 2006, pp. 52-67.
2. Baugh, R.J., Dickinson, C.D., Ruf, W., and Krishnaswamy, S., The Journal of Biological Chemistry, vol. 275, no. 37, 2000, p. 28826.
3. Zwaal, R.F.A., Comfurius, P., Bevers, E.M., Biochimica et Biophysica Acta., 1998, pp. 433-453.
4. Hathcock, J.J., Rusinova, E., Andree, H., and Nemerson, Y., Blood Cells, Molecules, and Diseases, vol. 36, 2006, p. 194.
5. Forman, S.D. and Nemerson, Y., Proc. Nati. Acad. Sci., vol. 83, 1986, p. 4675.
6. Podoplelova, N., Sveshnikova, A., Kurasawa, J., Sarafanov, A., Ataulakhanov, F., and Panteleev, M., Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 13, no. S2, 2015, p. 51.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОЛОГРАФИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ И КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛИНЫ ВОЛНЫ УЗКОПОЛОСНОГО СВЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Optical properties of holographic sensors and a colorimetric method determination of wavelength of narrow-band light radiation

Крайский А.В.1, Постников В.А.2, Султанов Т.Т.1, Миронова Т.Т.1, Крайский А.А.1, Шевченко М.А.1

1 – Физический институт им.П.Н.Лебедева РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 53;

2 – ФГУ«НИИ физико-химической медицины», ФМБА России, 119991, Москва, Малая Пироговская, д.1а

Тел.: +7(499)783-36-65; факс: +7(499)135-78-80; e-mail: kraiski@sci.lebedev.ru

Голографические сенсоры (ГС) – позволяют создать новый класс диагностических устройств для определения компонентов растворов и биологических жидкостей [1-2]. Они могут применяться в различных областях: медицине, пищевой промышленности мониторинге окружающей среды, в частности, водных ресурсов и т.п. ГС – это голограммы Денисюка, в которых голографический слой изменяет свою толщину под действием искомого вещества и цвет. отраженного света изменяется. Голографические слои изготавливаются на основе галоидного серебра, при этом получают нанозерна серебра

Предметом настоящего доклада являются оптические особенности голографических сенсоров и связанный с ними колориметрический способ измерения длин волн отраженного излучения. Точность определения длины волны отраженного света определяется толщиной голографического слоя, типом записанного на голограмме объекта и геометрией измерительной схемы. При высокой дифракционной эффективности линия может значительно уширяться, понижая точность измерения [3]. Линия отражения может уширяться и при неоднородном набухании слоя по глубине. В некоторых процессах может происходить резкое увеличение дифракционной эффективности, что приводит к уширению линии [2]. Для моделирования работы сенсора и определения параметров ГС в приближении эффективной среды на основе формулы Максвелла-Гарнетта разработана компьютерная модель распространения излучения в слоистой периодической среде нормально к плоскости слоев.

Для ускорения методов анализа был разработан колориметрический способ измерения средней длины волны узкополосного излучения, что позволяет по цифровому изображению определять концентрацию глюкозы во всех точках ГС одновременно [4-5]. Точность определения длины волны от 0.5 нм до 3 нм в зависимости от длины волны.

Метод высоко эффективен при проведении одновременных многоточечных анализов. Была показана реализуемость пространственной многоканальности ГС посредством разработки конструкции многоячеистого ГС и расширения рабочего диапазона колориметрического метода определения длины волны узкополосного излучения с помощью бытового цифрового фотоаппарата практически на всю видимую область 455 - 625 нм. Сочетание колориметрического метода анализа с многоточечным сенсором открывает возможности проведения одновременно большого количества анализов: от нескольких десятков.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» в 2007 – 2014 гг.

1. Yetisen, A. K.; Naydenova, I; da Cruz Vasconcellos, F.; Blyth, J.; Lowe, /C.R. Chem. Rev., 2014, 1409300950

РЕДОКС-ГОМЕОСТАЗ И ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛОВ В КЛЕТКАХ**Redox homeostasis and signal transduction in cells*****Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н.***

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь

e-mail: martinovichGG@bsu.by

Редокс-активные соединения (пероксид водорода, глутатион, аскорбиновая кислота и др.) являются важными участниками многих регуляторных путей в клетках, включая регуляцию экспрессии генов, клеточной пролиферации и апоптоза [1, 2]. В отличие от участвующих во внутриклеточной передаче сигналов вторичных мессенджеров, осуществляющих свое регуляторное действие путем изменения конформации белков-мишеней при взаимодействии со специфическими центрами связывания, редокс-активные соединения регулируют активность белков в результате переноса электронов между белком-мишенью и мессенджером. Из-за высокой химической активности редокс-активные соединения взаимодействуют как с мишенями, так и между собой, что также является важным их отличием от вторичных мессенджеров. Трансдукция регуляторного редокс-сигнала, при этом, осуществляется не отдельной молекулой-мессенджером, а группой взаимодействующих (функционально взаимосвязанных) редокс-активных соединений. Таким образом, внутриклеточные электрон-транспортные процессы, протекающие с участием редокс-активных соединений и белков, являются новым способом передачи информации в клетках [3, 4].

Поскольку направление переноса электронов обусловлена физико-химическими характеристиками участников редокс-процессов, трансдукция сигнала с участием редокс-мессенджеров может модулироваться изменением величин различных физико-химических параметров, включая параметры редокс-гомеостаза. Количественными характеристиками редокс-гомеостаза, обусловленного сопряженным функционированием транспортных белков, оксидоредуктаз и низкомолекулярных редокс-активных соединений, являются введенные нами параметры – эффективный редокс-потенциал ($E^{\text{эфф}}$) [5] и редокс-буферная емкость (r) [6]. Нами теоретически и экспериментально обоснована роль величин физико-химических параметров редокс-гомеостаза в реализации определенного отклика опухолевых клеток на действие редокс-активных соединений. Показано, что параметры внутриклеточного редокс-состояния ($E^{\text{эфф}}$, r) являются одними из основных факторов, определяющих специфичность отклика опухолевых клеток на действие редокс-активных соединений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант №М15-019).

1. Мартинович, Г.Г. и Черенкевич, С.Н., Окислительно-восстановительные процессы в клетках, Минск: БГУ, 2008.
2. Черенкевич, С.Н., Мартинович, Г.Г., и др., Известия НАН Беларуси. Сер. биол. наук, 2013, №1, сс. 92-108.
3. Jones, D.P., J. of Internal Medicine, 2010, vol. 268, no. 5, pp. 432-448.
4. Мартинович, Г.Г., Черенкевич, С.Н., и др., Биофизика, 2011, т. 56, сс. 465-474.
5. Martinovich, G.G., Cherenkevich, S.N., and Sauer, H., Eur. Biophys. J., 2005, vol. 34, pp. 937-942.
6. Martinovich, G.G., Martinovich, I.V., Cherenkevich, S.N., and Sauer, H., Cell Biochem. Biophys., 2010, vol. 58, no. 2, pp. 75-83.

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ

Redox regulation of programmed cell death

Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Вчерашняя А.В., Шадыро О.И., Черенкевич С.Н.

Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Республика Беларусь

e-mail: martinovichGG@bsu.by

На протяжении многих лет основными изучаемыми в биологических системах явлениями, связанными с редокс-процессами, являлись процессы фотосинтеза и окислительного фосфорилирования, а также развивающийся в процессе нарушения электрон-транспортных процессов окислительный стресс. В результате окислительного стресса наблюдается повреждение биомолекул и гибель клеток. Индуцирование окислительного стресса широко используется в методах противоопухолевой терапии. Наряду с этим, ведутся разработки более эффективных технологий противоопухолевой терапии, задачей которых является регуляция редокс-процессов в клетках [1, 2]. Установлено, что редокс-регуляция или регуляция процессов жизнедеятельности на основе механизмов межмолекулярного переноса электронов является одним из типов управления функционированием живых систем [3, 4]. В отличие от окислительного стресса при редокс-регуляции наблюдается не повреждение биомолекул, а модификация активности определенных клеточных белков в результате изменения редокс-состояния их ключевых функциональных групп атомов.

В результате экспериментальных исследований, проведенных с использованием различных редокс-активных соединений (аскорбиновая кислота, монофенолы, *para*-бензохиноны и др.), нами описан новый путь редокс-регуляции программируемой гибели клеток, согласно которому запуск митохондриально-опосредованного апоптоза происходит в результате кратковременного усиления локальной продукции активных форм кислорода (АФК) за счет участия специфических оксидоредуктаз. Нами показано, что активация данного механизма сопровождается снижением митохондриального мембранного потенциала и блокируется ингибитором пор высокой проводимости – циклоспорином А. Предполагается, что ключевой мишенью редокс-зависимой активации апоптоза может выступать адениннуклеотидный транспортер ANT. Повышение продукции АФК в митохондриях вызывает окисление сульфгидрильных групп адениннуклеотидного транспортера ANT внутренней мембраны митохондрий, что приводит к образованию поры высокой проводимости в результате формирования комплекса с участием циклофилина D, ANT и потенциал-зависимого анионного канала VDAC внешней мембраны митохондрий. Открытие пор высокой проводимости сопровождается деполяризацией внутренней мембраны митохондрий и приводит к высвобождению цитохрома c и апоптоз-индуцирующего фактора AIF, что является начальной стадией апоптоза. Существенным элементом предложенного нами механизма является зависимость данного пути передачи сигналов от величин параметров редокс-состояния клетки.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (грант №M15-019).

1. Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P., Nat. Rev. Drug Discov., 2009, vol. 8, pp. 579-591.
2. Мартинович, Г.Г., Мартинович, И.В., и др., Известия НАН Беларуси. Сер мед наук, 2012, no. 2, pp. 85-104.
3. Мартинович, Г.Г. и Черенкевич, С.Н., Окислительно-восстановительные процессы в клетках, Минск: БГУ, 2008.
4. Jones, D.P., J. of Internal Medicine, 2010, vol. 268, pp. 432-448.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ**The influence of the phospholipase A_2 inhibitors on Na^+ transport in frog skin****Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И.**

Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Тел.: +7(812) 328-94-65; e-mail: avm242@hotmail.ru.

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки.

Арахидоновая кислота (АК) и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов. В частности, многие ионные каналы являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов. В реабсорбирующих эпителиях АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. В коже лягушки простагландины стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ , усиливают секрецию ионов K^+ и увеличивают проницаемость апикальной мембраны для воды. В то же время, в культуре кортикальных собирательных трубочек почки мыши ингибиторы циклооксигеназ диклофенак и ибупрофен подавляют транспорт Na^+ .

Одним из основных механизмов образования свободной АК является гидролиз мембранных фосфолипидов под действием фосфолипазы A_2 (ФЛА₂). В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль ФЛА₂ в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. В экспериментах использовали два структурно различных ингибитора ФЛА₂

ковалентный ингибитор ФЛА₂ 4-бромфенацилбромид и синтетический глюкокортико-стероидный препарат дексаметазон.

Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки *Rana temporaria* использовали автоматизированную установку фиксации потенциала. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$.

Впервые показано, что ингибиторы ФЛА₂ дексаметазон и 4-бромфенацилбромид подавляют транспорт Na^+ в коже лягушки. Так, обработка апикальной поверхности кожи 8 мкг/мл дексаметазона или 20 мкМ 4-бромфенацилбромида (по данным 10 экспериментов) снижает I_{SC} на 54.87 ± 19.34 или 13.18 ± 4.08 %, V_{OC} – на 45.07 ± 13.85 или 5.93 ± 2.50 %, а g_T – на 22.16 ± 9.12 или 15.85 ± 4.13 %, для дексаметазона и 4-бромфенацилбромида, соответственно. Полученные данные свидетельствуют об участии ФЛА₂ и каскада метаболизма АК в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки.

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВАОГО КАНАЛА В СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

The role of the mitochondrial ATP-dependent potassium channel in structural changes of cardiomyocytes under hypoxic hypoxia

Миронова Г.Д.1,2, Розова Е.В.3, Маньковская И.Н.3.

1 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

2 – Пущинский Государственный естественно-научный институт, 142290, Пущино Московской области, просп. Науки, д.3

3- Институт физиологии им. А. Богомольца НАН Украины, 01024, г. Киев ул. Богомольца 4
Тел.: 8(4967)739329; факс:8(4967)330553; e-mail: mironova40@iteb.ru

Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей в организме является повреждение митохондрий, сопровождающееся нарушениями энергообеспечения и антиоксидантной защиты, а также стабильности мембран вследствие интенсификации образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Митохондрии миокарда, как известно, имеют определённый характер локализации по клетке. При изменении условий существования клетки, элементы цитоскелета, обеспечивающие перемещение митохондрий в участки, где облегчена диффузия O₂, подвержены значительным модуляциям. Механизм этого явления, наблюдаемого при различных эндо- и экзогенных воздействиях, пока не выяснен. Недавно, была выявлена специфическая форма изменений митохондрий кардиомиоцитов в условиях *in vitro* при длительной (в течении 6-72 часов при температуре +20°C) инкубации кусочков сердца в среде, лишённой O₂. При этом в структурно поврежденных органеллах выявляются микромитохондрии диаметром до 0,15 мкм. Показано, что образующиеся микромитохондрии полностью или частично наследуют функции «родительских» митохондрий. При этом механизмы, ответственные за подобные изменения ультраструктуры митохондрий, остаются невыясненными. В связи с вышесказанным, целью настоящей работы было изучение изменений пространственного расположения и ультраструктуры митохондрий в кардиомиоцитах при воздействии на животных *in vivo* острой 30-и мин. гипоксической гипоксии. Исследованы изменения ультраструктуры и пространственной локализации митохондрий в миокарде при 30-и минутной гипоксической гипоксии. В этих условиях митохондрии изменяют свою структуру, однако выраженных некротических повреждений в них не обнаружено. При этом в миокарде появляются изменения, направленные на усиление энергетических процессов. Это выражается в увеличении количества митохондрий в субсарколемальной зоне гипоксического миокарда с изменением поверхности сублемальной мембраны в виде её изгибов вокруг митохондрий, что улучшает условия диффузии кислорода к митохондриям благодаря возрастанию площади диффузии. Усиливается также деление митохондрий, что способствует увеличению их количества. В структурно измененных митохондриях обнаруживаются небольшого диаметра электронноплотные образования, представляющие собой вновь образующиеся органеллы – микромитохондрии – на различных стадиях структурной организации, чего не наблюдается в миокарде при нормоксии. Выявлено, что одним из регуляторов морфологического состояния митохондрий при гипоксической гипоксии является АТФ-зависимый калиевый канал: активатор канала увеличивает количество вновь образованных микромитохондрий, а ингибитор – предотвращает их образование. Обсуждаются возможные механизмы появления структурно-динамических изменений в митохондриальном аппарате миокарда крыс при острой гипоксической гипоксии.

Работа поддержана грантами Правительства РФ №14.Z50.31.0028 и ДПННУТ № 2014/281/2495.

ЛАМЕЛЛЯРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГРЫЗУНОВ С ДНЕВНЫМ ТИПОМ СУТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ**Lamellar inclusions in the retinal pigment epithelium of diurnal rodents****Самосудова Н.В.1, Орлов О.Ю.1, Голышев С.А.2.**

1 – Институт проблем передачи информации им.А.А. Харкевича АН, 127051, Москва, Б.Каретный пер., д.19

2 – ИФХБим. А.Н. Белозерского, 119991, МГУ им. Ломоносова, Москва, Ленинские Горы, 1, с. 2.
e-mail:nsamos@iitp.ru

Характерной особенностью биофизики фоторецепции является необходимость постоянного обновления рецепторных мембран, несущих молекулы зрительных пигментов. Палочки и колбочки сетчатки регулярно отчлениют пачки дисков с апикального конца наружных сегментов (НС), взамен которых в базальной части НС формируются новые диски. Круговорот структурного материала мембран включает переваривание старых дисков клетками пигментного эпителия (ПЭ). В тесно связанном комплексе фоторецепторов сетчатки и пигментного эпителия поддерживается динамический баланс, однако этот процесс протекает не непрерывно, а ритмически: суточная ритмика светового режима задает ритмику фаз отчленения (шеддинга) отработанных дисков НС, их захвата клетками ПЭ и последующего быстрого фагоцитоза. Избыток гидрофобного продукта фагоцитоза -липидной составляющей мембран, в цитоплазме вреден для клеток ПЭ. Это диктует необходимость депонирования липофильных продуктов фагоцитоза дисков НС. У низших позвоночных и птиц такими депо служат миелоидные тела (МТ) – многослойные мембранные образования с четко выраженной периодикой, образуемые путем модификации гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР). У млекопитающих шеддинг НС и их фагоцитоз протекают так же, как у остальных позвоночных, однако миелоидных тел, как правило, у них не находят. Вопрос о способе решения этой проблемы ставил задачу поиска ламеллярных ультраструктурных включений в клетках ПЭ у желтой пеструшки [1] и полёвки Брандта – грызунов с дневным типом суточной активности. В гидрофильной цитоплазме клеток гидрофобные по своей природе липиды могут находиться в одном из двух агрегатных состояний: жидком («масляная капля») или ламеллярно-упорядоченном (как МТ). В клетках ПЭ дневного грызуна (полёвки Брандта) не найдено типичных МТ, но обнаружены иные мультиламеллярные ультраструктуры. Одни не являются производными ГЭР, имеют форму спирали и размер от 200 до 400 нм, другие включения представляют собой гранулы (независимые от ГЭР). Они окружены мембраной и имеют внутреннюю концентрическую структуру с периодичностью ~ 11.4 нм. Мы полагаем, что наблюдаемые нами мультиламеллярные включения в ПЭ грызунов могут служить временными депо липидного материала, образующегося после переработки НС в фагосомах.

1. Самосудова, Н.В., Орлов, О.Ю., и Голышев, С.А., Бюл. экспер. биол. и мед., 2013, т. 156, № 12, сс. 843-847.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ КОЛБОЧЕК

Metabolic activity of the cone lipid droplets

Орлов О.Ю.1, Голубева Т.Б.2, Голышев С.А.3, Зак П.П.4, Серезжникова Н.Б.2,4.

1 – Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051, Москва, Б. Каретный пер., д.19

2 – Биологический факультет МГУ им. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы

3 – Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, МГУ; 4 – Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4

e-mail: graf@iitp.ru

Крупные липидные включения (масляные капли), расположенные на пути света к воспринимающим свет наружным сегментам, являются характерным компонентом колбочек сетчатки многих позвоночных. Ярко окрашенные каротиноидами у большинства видов птиц и черепах, они издавна служат предметом изучения свойств преломляющего элемента и цветного светофильтра миниатюрной оптической системы [1] и её роли в цветовом зрении животных в их среде обитания [2,3]. В обоих случаях, липидные капли рассматриваются как метаболически инертные структуры чисто оптического назначения. Между тем, накапливаются данные об их метаболической активности. Так, зависящий от присутствия каротиноидов цвет каплей может меняться не только в зависимости от рациона [4], но и от спектрального состава освещения, при котором содержатся птицы [5]. В пользу участия липидных капель в метаболизме колбочек говорит их мечение при инъекции жирных кислот с радиоактивной меткой [6]. Ультраструктура масляных капель свидетельствует об их тесном взаимодействии с прилежащими митохондриями: в иллюстрациях многих публикаций по тонкой структуре колбочек разных животных ясно виден тесный контакт липидной капли с окружающими митохондриями: полное отсутствие внешней мембраны митохондрии, а в ряде случаев прямое проникновение жидкой массы капли между прилежащими митохондриями. Наши собственные данные по ультраструктуре колбочек прудовой лягушки *Rana lessonae* и японского перепела *Coturnix japonicus* выявляют с несомненностью два явления: деструкцию внешней мембраны у прилежащих митондрий, и реструктуризацию липидной массы капли, исходно гомогенной, с формированием множества протяженных структур, подобных пленкам, иницируемую прилежащими митохондриями. В ряде случаев видна полная утрата митохондриями границы с липидной каплей на участке прилегания к ней. В липидных каплях колбочек лягушки, в норме бесструктурно-гомогенных, после интенсивной световой нагрузки (1ч, 70000 люкс) формируется осмиофильная масса с характерной зернистостью. Некоторые сходные вещи уже отмечались прежними авторами в своих иллюстрациях.

Нельзя исключить, что окруженная митохондриями эллипсоида, липидная капля колбочки может служить уникальным объектом для изучения проблем взаимодействия митондрий с липидной каплей активируемой (возбудимой светом) клетки.

1. Говардовский, В.И., и др., Журн. Эвол. Биохим. Физиол., 1981, т. 17, сс. 492-496.
2. Говардовский, В.И. и Воробьев М.В., Сенсорные системы, 1989, т. 3, сс. 150-158.
3. Stavenga, D.G. and Wilts, B.D., Phil. Trans. R. Soc. B., 2014, vol. 369.
4. Knott B., et al., Proc. Roy. Soc. B., 2010, vol. 277, pp. 953-962. DOI:10.1098/rspb.2009.1805.
5. Corbo, J.C., et al., Tvaerminne VISIONARIUM-XIII, 2014, Helsinki University.
6. Gordon, W.C. and Bazan N.G., Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 1993, vol. 34, no. 8, pp. 2402-2411.

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ ЛАНТИБИОТИКАМИ ИХ МИШЕНЕЙ В БИОМЕМБРАНАХ:
ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ****Molecular mechanism of target recognition by lantibiotics in biomembranes: investigation by
method of molecular dynamics****Панина И.С.1, Чугунов А.О.1, Нольде Д.Е.1,2, Ефремов Р.Г.1,2**1 — Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, 117997, город Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/102 — Межведомственный суперкомпьютерный центр Российской академии наук, 119991, Москва,
Ленинский проспект, дом 32а; e-mail: irinaspanina@gmail.com

Низин — посттрансляционно модифицированный антибактериальный пептид, принадлежащий классу лантибиотиков (лантионин-содержащих антибиотиков). Лантибиотики ингибируют синтез клеточной стенки бактерий путем связывания в комплекс трансмембранного переносчика ее мономерных звеньев — липида-II, локализуемого в мембране. Мишенью лантибиотиков является консервативный участок (пирофосфат) липида-II, изменить который существенно сложнее, чем заменить в составе белка одну аминокислоту другой. Поэтому лантибиотики считаются перспективными прототипами антибиотиков нового поколения, лишенных недостатка развития резистентности у бактерий. Для направленного дизайна новых бактерицидных средств необходимо установить механизм молекулярного взаимодействия низин-липид-II. Существует полученная методом ЯМР структура комплекса низина с липидом-II в ДМСО [1]. В комплексе первые два кольца низина при помощи водородных связей образуют «ловушку» пирофосфата. Однако на поверхности мембраны, в условиях дополнительных стерических ограничений, структура комплекса может отличаться. Чтобы получить представление о комплексе в мембране и механизме межмолекулярного распознавания, и ввиду невозможности смоделировать процесс связывания целиком, проведены расчеты молекулярной динамики следующих систем: липида-II, встроенного в липидный бислой пальмитоилолеоилфосфотидилглицерина (ПОФГ) и пальмитоилолеоилфосфотидилэтаноламина (ПОФЭ) в соотношении 3:1; низина в водном растворе; комплекса низина с липидом-II в воде и в ДМСО. В результате показано, что пирофосфатная группа мономера липида-II в бислое принимает несколько конформаций, обусловленных вращением головки и хвоста молекулы вокруг оси Р-Р. При переходе между состояниями меняется положение пирофосфатной группы относительно поверхности мембраны и площадь его поверхности, доступной растворителю. Мы полагаем, что одна из этих конформаций является «активной», т.е. готовой к захвату ловушкой (низин). Установлено, что толщина мембраны неоднородна в присутствии липида-II: близ него образуется двусторонняя впадина, размер и положение которой также изменяются при переходе от одной конформации пирофосфата к другой. Мы предполагаем, что липид-II вместе с окружающими его липидами мембраны образуют специфическую платформу, распознаваемую лантибиотиками как сайт связывания [2]. Кроме того, получен набор состояний комплекса, отличных в воде и в ДМСО. Структура молекул в комплексе не соответствует найденным конформациям несвязанного низина в воде и липида-II в бислое. Это может означать, что в естественной среде — мембране — комплекс образуется за счет индуцированного соответствия обеих молекул. Путем совмещения полученных структур комплекса с «активной» конформацией липида-II в мембране в большинстве случаев мы получили потенциально возможные, стерически не затрудненные модели. Следующим шагом станет изучение структурно-динамического поведения комплекса на поверхности бислоя.

1. Hsu, S., et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2004, vol. 11, pp. 963-967.

2. Chugunov, A., et al., Sci. Rep., 2013, vol. 3, p. 1678.

МЕМБРАННО-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Membrane-dependent reactions of blood coagulation

Пантелеев М.А., Свешникова А.Н., Котова Я.Н., Подоплелова Н.А.

ЦТП ФХФ РАН, 119991 Москва, ул. Косыгина 4

ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, 117997 Москва, ул. Саморы Машела 1

МГУ имени М.В.Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1с2, физический факультет

Тел.: +7(495) -287-65-70 доп. 5601; e-mail: mapanteleev@yandex.ru

Свертывание крови представляет собой сложный каскад ферментативных реакций, играющий ключевые роли в гемостазе, иммунитете, ангиогенезе и других жизненно важных процессах. Главные реакции каскада свертывания протекают не в жидкой фазе (т.е. плазме крови), а в двухмерной фазе — на фосфолипидных мембранах. Эти мембраны для сборки белковых комплексов в различных реакциях предоставляются практически всеми клетками, липопротеидами и микрочастицами сосудистого русла. Центральную роль среди этих источников мембран играют активированные тромбоциты и отщепляемые ими микровезикулы, на которых происходят прокоагулянтные реакции — активация фактора X и протромбина, запуск контактного пути свертывания, активация фактора XI тромбином и другие. Значимость мембранных реакций многообразна: липидные мембраны ускоряют реакции свертывания на много порядков, эти реакции служат связующим звеном плазменного и тромбоцитарного гемостаза, связанные факторы защищены от ингибиторов плазмы крови и вымывания потоком, практически все мембранные реакции работают в положительных обратных связях каскада свертывания.

Несмотря на значительный прогресс в данной области, мембранные реакции представляют собой одну из наиболее крупных загадок в свертывании крови. Их механизмы плохо изучены, математические модели несовершенны, значимость отдельных поверхностей и реакций неясна. Систематизация представлений в данной области, рассказ о последних достижениях в ней, обсуждение дальнейших перспектив являются темами нашего сообщения.

ИЗМЕНЕНИЯ РЕЛЬЕФА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ УЧАСТНИК ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА**Changes in erythrocyte plasma membrane surface relief as possible participant in volume regulation signal transduction**

Паршина Е.Ю., Юсипович А.И., Силичева М.А., Орлов С.Н., Максимов Г.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, 119234, Москва, Воробьевы горы, 1

Тел.: +7(495)939-19-66; e-mail: parshinae@gmail.com

Мембраны живых клеток подвержены динамическим флуктуациям, что вызывает образование выступов и впадин на поверхности клеток. Перепады рельефа поверхности мембраны эритроцитов обусловлены механическими свойствами мембраны, которые в свою очередь определяются состоянием цитоскелета [1, 2]. На свойства эритроцитарного цитоскелета могут оказывать влияние различные физические факторы (температура [3]) и сигнальные и биологически активные молекулы (АТФ) [2].

С помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) зарегистрирован поверхностный рельеф фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов человека на воздухе, который, по-видимому, отражает способность мембраны нативных эритроцитов совершать динамические флуктуации в водной среде. Разработан подход к анализу поверхностного рельефа эритроцитов, позволяющий рассматривать отдельно перепады рельефа поверхности мембраны и шероховатость поверхности, обусловленную экспонированными в наружную среду доменами примембранных и трансмембранных белков.

Показано, что разрушение цитоскелета нагреванием до 49 °С вызывает увеличение перепадов рельефа поверхности эритроцитов, что свидетельствует о непосредственной связи регистрируемых методом АСМ особенностей рельефа с состоянием цитоскелета.

Исследовано влияние осмолярности среды, вызывающей изменения объема эритроцитов, на рельеф поверхности эритроцитов с нативным и разрушенным цитоскелетом. Показано, что при уменьшении осмолярности среды перепады рельефа снижаются, в то время как в эритроцитах с разрушенным цитоскелетом такой зависимости не наблюдается.

Исследование активности K^+ , Cl^- -котранспортера эритроцитов в тех же условиях показало, что снижение осмолярности, приводящее к увеличению объема клеток вызывает активацию котранспортера, вызывающую регуляторное уменьшение объема. При разрушении цитоскелета подобная зависимость исчезает [4].

Полученные результаты позволяют предположить, что перепады рельефа поверхности эритроцитов зависят от осмолярности и могут участвовать в передаче сигнала регуляции клеточного объема.

1. Girasole, M., Pompeo, G., et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, vol. 1768, pp. 1268-1276.
2. Park, Y., Best, C.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, pp. 1289-1294.
3. Brandts, J.F., Taverna, R.D., et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1978, vol. 512, pp. 566-578.
4. Parshina, E.Yu., Yusipovich, A.I., et al., *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 2013, vol. 465, pp. 977-983.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ РЯДОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИОКСИДАНТОВ НА СТРУКТУРУ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНЫ И МОРФОЛОГИЮ ЭРИТРОЦИТОВ

The influence of derivatives of synthetic antioxidant series on the structure of erythrocyte membrane and erythrocyte morphology

Паршина Е.Ю.1, Лунева О.Г.1, Силичева М.А. 1, Рахбанова З.М.1, Гендель Л.Я.2, Рубин А.Б.1

1 – Биологический факультет Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, Москва

2 – Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Тел.: +7(495)939-19-66, факс: +7(495)939-11-15, e-mail: parshinae@gmail.com

Методами спиновых зондов, сканирующей электронной и световой микроскопии в широком диапазоне концентраций изучено влияние синтетических антиоксидантов – производных

5-гидроксibenзимидазола (5-ГБИ), анфенов, являющихся производными L-тирозина и комбинированных антиоксидантов – ихфанов на структуру эритроцитарной мембраны и морфологию эритроцитов.

На основании анализа спектров ЭПР установлено, что наиболее гидрофобные соединения ряда 5-ГБИ, имеющие бензильный заместитель, оказывают структурно-модифицирующее действие на мембрану.

Выявлены структурные изменения эритроцитарной мембраны, обусловленные встраиванием в мембрану и распределением во внутримембранном пространстве ихфанов. Показано, что производные ряда ихфанов способны индуцировать уменьшение микровязкости различных, по удаленности от поверхности мембраны, областей внутримембранного пространства.

Установлено, что производные ряда 5-ГБИ проявляют эхиноцитогенное действие, изученные в работе гидрофобные производные ряда анфенов обладают стоматоцитогенной активностью, тогда как производные ряда ихфанов, в зависимости от их гидрофобных свойств, вызывают переходы эритроцитов в форму эхиноцитов или стоматоцитов.

Определены различия в распределении и эффективности модифицирующего действия разных по структуре и гидрофобным свойствам производных рядов исследованных антиоксидантов, сделаны предположения об особенностях процесса их мембранного транспорта, локализации в мембране и реализации биологической активности данных соединений.

РЕГУЛЯЦИЯ GARDOS-КАНАЛОВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ: РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА

Петрова И.В. 1, Розенбаум Ю.А. 1, Бирulina Ю.Г. 1, Ковалев И.В. 1, Гусакова С.В. 1, Трубачева О.А. 2

1 – Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2;

2 – НИИ кардиологии, Россия, 634012, Томск, ул. Киевская, 111а

e-mail; ivpetrova57@yandex.ru

Gardos-каналы эритроцитов относятся к Ca^{2+} -зависимым калиевым каналам средней проводимости, они участвуют в программируемой гибели красных клеток крови (эриптозе), играют определенную роль в деформируемости и изменении объема эритроцитов. Открытие Gardos-каналов вызывает утечку ионов калия, что обеспечивает гиперполяризацию мембраны. Переход каналов в открытое состояние происходит либо при увеличении внутриклеточной концентрации ионов кальция, либо при действии редокс-агентов. Установлено, что Gardos-каналы регулируются различными способами: протеинкиназами, белками цитоскелета, газовыми посредниками (NO, CO).

Целью настоящей работы было исследовать влияние донора H_2S – гидросульфида натрия (NaHS), на амплитуду Ca^{2+} - и редокс-стимулированного гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов.

В работе использовалась кровь здоровых доноров обоего пола (25 человек). Получение упакованных эритроцитов проводилось стандартным методом. Для изучения Gardos-каналов применялся потенциометрический метод непрерывной регистрации мембранного потенциала клеток по изменениям pH среды, основанный на том, что в присутствии протонифора (20 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон) распределение H^+ зависит от мембранного потенциала E_m как $E_m = RT/F (\text{pH}_i - \text{pH}_o)$, где pH_i и pH_o - значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. Для получения Ca^{2+} -и редокс-стимулированного ГО в среду инкубации клеток вводили Ca^{2+} -ионофор A23187 (0,5 мкМ), либо искусственную электронно-донорную систему аскорбат (10 мМ) – феназинметосульфат (0,1 мМ). В обоих случаях развивался ГО мембраны эритроцитов, амплитуда которого отражала активность изучаемых каналов. NaHS (0,005; 0,1; 0,15; 0,3; 0,8; 1,6 мМ) добавлялся за 5 мин до внесения в суспензию эритроцитов агентов, вызывающих ГО. Изменения амплитуды Ca^{2+} - и редокс-стимулированного ГО проявляли различную динамику. Так, NaHS в концентрации 0,005 мМ вызывал достоверное увеличение исследуемого параметра, тогда как амплитуда редокс-стимулированного ГО не изменялась. Амплитуда Ca^{2+} -индуцированного ГО в присутствии 0,1 мМ NaHS снижалась на 60%, в то время как амплитуда редокс-стимулированного ГО не отличалась от исходного значения. Ca^{2+} -индуцированный ГО практически не развивался в присутствии 0,2 мМ NaHS, тогда как подавление редокс-индуцированного ГО происходило при добавлении 1,6 мМ NaHS. Таким образом, Ca^{2+} -индуцированный гиперполяризационный ответ мембраны эритроцитов оказался более чувствителен к действию сероводорода, чем редокс-стимулированный: для снижения амплитуды Ca^{2+} -стимулированного ГО мембраны эритроцитов требуются существенно меньшие концентрации NaHS, чем для снижения амплитуды редокс-стимулированного ГО на ту же величину. Причиной полученных эффектов может быть влияние сероводорода как на белки самого ионного канала, так и на его регуляторные белки, в частности, на НАДН-дегидрогеназу - одного из компонентов электронно-транспортной цепи, присутствующей на мембране эритроцитов.

РОЛЬ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗЫ-1 В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

Impact of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the glutamate-induced disturbances of calcium homeostasis in cultured rat cerebellar neurons

Пинелис В.Г.1, Красильникова И.А.1, Персиянцева Н.А.1, Ефремова А.С.4, Шрам С.И.4, Горбачева Л.Р.3, Савинкова И.Г.3, Сурин А.М.1,2,3

1 – ФГБНУ Научный Центр здоровья детей МЗ РФ, 119991, Москва, Ломоносовский пр-кт, 2 стр.1

2 – ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, Балтийская ул., 8

3 – ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, МЗ РФ 117513, Москва, ул.Островитянова, 1

4 – Институт молекулярной генетики, РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2, Москва

Тел.: +7(916)686-77-24; e-mail: pinelis@mail.ru

Гиперстимуляция глутаматных (Glu) рецепторов культивируемых нейронов мозга ведет к развитию отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД) и митохондриальной деполяризации (МД). Известно также, что Glu и активные формы кислорода вызывают избыточную активацию ядерного фермента поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP-1), вызывающая истощение NAD^+ , необходимого для производства АТФ. Однако механизмы этой активации окончательно не установлены. Исследование выполнено на культурах гранулярных нейронов мозжечка (ГНМ) крысы. Показано, что ингибиторы PARP-1 бензамид (БА) и миноциклин (Мнц) отодвигали наступление Glu-вызванного ОКД, не влияя на синхронность ОКД и МД. Биохимический анализ содержания NAD^+ и $NADH$ в клетках показал, что Glu вызывал снижение NAD^+ на 25% относительно уровня в покоящихся клетках, тогда как $NADH$ падал на 75%. Мнц удерживал NAD^+ при действии Glu на контрольном уровне, но не предотвращал падения $NADH$. Блокада дыхательной цепи цианидом (ЗММ) в фазе развития ОКД или в самом начале $[Ca^{2+}]_i$ плато вызывала такой же подъем $NADH$, как и в нейронах, находившихся к моменту добавления CN в первой фазе $[Ca^{2+}]_i$ ответа на Glu. Из этого следует, что развитие ОКД, не является последствием истощения NAD^+ . Для дополнительной проверки этого предположения были измерены Glu-индуцированные изменения $[Ca^{2+}]_i$, а затем методом иммуноцитофлуоресценции определяли распределение поли(АДФ-рибозы) (PAR) в этих же самых клетках. Обнаружено, что большинство нейронов, в которых возникла ОКД, имели распределение PAR преимущественно по периметру ядра. Обработка сестринской нейрональной культуры или клеток PC12 пероксидом водорода показала, что H_2O_2 вызывает образование PAR только в ядерной области, указывая на то, что эффект Glu не связан с плохим проникновением антител в ядро. Исследование протекторного действия ингибиторов PARP-1 (МТТ-тест и окраска флуоресцентными витальными красителями) показало, что они снижают долю ГНМ, погибших от Glu. Полученные результаты свидетельствуют, что одним из факторов развития ОКД и последующей гибели нейронов может быть синергизм токсического действия PAR на внешнюю мембрану митохондрий и поступающего в матрикс Ca^{2+} .

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01961-а и 13-04-40084.

УПРУГО-ЭЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТОПОГРАФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЛАЗМАЛЕММЫ ГЕМОЦИТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОДКЛАССА HIRUDINOMORPHA ПРИ ДЕЙСТВИИ ОСМОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ**Elastic properties and topographical characteristics hemocytes membrane of Hirudinomorpha representatives in osmotic pressure****Присный А.А.**ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
308015, Белгород, ул. Победы, 85

Тел.: +7(4722)30-18-63; e-mail: Prisny@bsu.edu.ru

Упругость клеточной мембраны связана с изменением расположения фибрилл цитоскелета, а вязкость с переходом холестерина из внутреннего слоя мембраны в наружный и наоборот [1]. Жесткость подмембранного каркаса определяет функциональную активность клетки, направленное движение и участие в фагоцитозе, являясь неотъемлемым критерием, который описывает важнейшую концепцию биологии – концепцию адаптации [2]. Модуль упругости может быть использован в качестве показателя реорганизации цитоскелета во время адгезии, при этом происходит увеличение эластичности в 2-3 раза [3]. При снижении осмотического давления у больших амебоцитов представителей подкласса *Hirudinomorpha* наблюдали сходную реакцию – значения упругости мембраны снижаются, а адгезионные свойства клеток возрастают. В условиях повышенной солености жесткость мембраны больших амебоцитов *H. medicinalis* и *E. octoculata* возрастает, поверхность клеток *H. sanguisuga* наоборот приобретает большую упругость. Таким образом, увеличение жесткости мембраны происходит у амебоцитов *H. medicinalis* и *E. octoculata* при любом изменении осмотического давления, причем упругость мембраны не соотносится с адгезионными свойствами. Адгезия амебоцитов *H. medicinalis* повышается в гипотонических условиях и снижается в гипертонических, у подвижных гемоцитов *E. octoculata* отметили обратную закономерность. Сравнительный анализ показателей шероховатости поверхности, продемонстрировал, что поверхность гемоцитов медицинской пиявки варьирует по количеству выпячиваний. Микрорельеф клеток *H. medicinalis* имеет наиболее плотное расположение микровыпячиваний среди всех описанных гемоцитов пиявок. Наименьшие значения шероховатости отмечены у больших амебоцитов *E. octoculata*.

1. Дерябин, Д.Г., Функциональная морфология клетки, М: КДУ, 2005, 320 с.
2. Эккерт, Р., Рэндел, Д., и Огастин, Дж., Физиология животных: механизмы и адаптации, т. 1, М.: Мир, 1991, 423 с.
3. Simone, A. and Durrie, M.C., Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion Micron, 2006, vol. 37, pp. 1-13.

МОЛЕКУЛЫ ФОСФОЛИПИДОВ В БИСЛОЯХ: ОРИЕНТАЦИОННОЕ УПОРЯДОЧЕНИЕ СВЯЗЕЙ (МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Phospholipid molecules in bilayers: bond orientation ordering (molecular dynamics simulations)

Рабинович А.Л.1, Любарцев А.П.2

1 – Институт биологии Карельского научного центра РАН, 185910, Петрозаводск, ул.Пушкинская, 11;

2 – Stockholm University, 106 91 Stockholm, Svante Arrhenius väg 16 C, Sweden
Тел.: +7(8142)57-18-79; факс: +7(8142)76-98-10; E-mail: rabinov@krc.karelia.ru

Методом молекулярной динамики моделировали гомогенные гидратированные бислои, образованные следующими молекулами фосфатидилхолинов (ФХ): 16:0/18:1 ω 9cis ФХ, 16:0/18:2 ω 6cis ФХ, 16:0/18:3 ω 3cis ФХ, 16:0/18:4 ω 3cis ФХ, 16:0/18:5 ω 3cis ФХ, 16:0/20:4 ω 6cis ФХ, 16:0/20:5 ω 3cis ФХ, 16:0/22:6 ω 3cis ФХ, 18:0/18:1 ω 9cis ФХ, 18:0/18:2 ω 6cis ФХ, 18:0/18:3 ω 3cis ФХ, 18:0/18:4 ω 3cis ФХ, 18:0/18:5 ω 3cis ФХ, 18:0/20:4 ω 6cis ФХ, 18:0/20:5 ω 3cis ФХ, 18:0/22:6 ω 3cis ФХ. Моделирование проведено в полноатомном приближении, изучено жидкокристаллическое состояние при T=303 К, P = 1 атм. Расчетная периодическая ячейка каждого бислоя имела форму прямоугольного параллелепипеда (ось Z отвечала нормали к поверхности), содержала 128 молекул ФХ одного из перечисленных типов (по 64 на монослой) и 3840 молекул воды (30 на каждую молекулу ФХ). Использован полуанизотропный NPT-ансамбль с двумя степенями свободы: одна в направлении оси Z, другая – XY (так, чтобы размеры ячейки вдоль осей X и Y в латеральной плоскости в каждый момент времени были одинаковыми). Координаты атомов записывали с интервалом 1 пс, длина траектории составляла для каждого бислоя 100 нс (первые 20 нс служили участками релаксации) [1].

Рассчитана большая совокупность характеристик, относящихся как к бислою в целом, так и к каждой цепи, в том числе: площадь, приходящаяся на молекулу ФХ в латеральной плоскости; профили параметров порядка связей С-С и С-Н относительно нормали к поверхности бислоев. Особое внимание уделено изучению ориентационного упорядочения этих связей: вычислены плотности вероятности распределения по ориентациям связей относительно нормали, и с их помощью рассчитаны “коэффициенты анизотропии”. Оказалось, что такой подход позволяет достигнуть более глубокого понимания общей картины упорядочения связей в бислоях фосфолипидов разной структуры.

Показано, что в насыщенных и ненасыщенных углеводородных цепях молекул ФХ изученного строения, образующих гидратированные бислои, в жидкокристаллическом состоянии сосуществуют определенные зоны с разным характером ориентационного упорядочения связей, определяемым строением локальных участков цепи. Предложена определенная классификация типов упорядочения (и соответствующих зон). Например, согласно этой классификации, в полиненасыщенных цепях все связи вблизи групп CH₂, расположенных между двумя двойными связями С=С, характеризуются квази-изотропным упорядочением, а связи во фрагментах вблизи двойных связей – анизотропным; обе зоны сосуществуют на протяженном участке таких цепей.

Работа выполнена при поддержке программы Президента РФ – Ведущие научные школы (НШ-1410.2014.4), гранта Vetenskapsrådet (621-2007-5256).

1. Rabinovich, A.L. and Lyubartsev, A.P., Journal of Physics: Conference Series, 2014, vol. 510, p. 012022.

СВОЙСТВА УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЦЕПЕЙ МОЛЕКУЛ ФОСФОЛИПИДОВ В ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ БИСЛОЯХ И В НЕВОЗМУЩЕННОМ СОСТОЯНИИ (КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ)**Properties of hydrocarbon chains of phospholipids in liquid crystalline bilayers and in unperturbed state (computer simulations)****Рабинович А.Л. 1, Журкин Д.В.2, Любарцев А.П.3**

1 – Институт биологии Карельского научного центра РАН, 185910, Петрозаводск, Пушкинская, 11

2 – Петрозаводский государственный университет, 185910, Петрозаводск, ул. Ленина, 33

3 – Stockholm University, 106 91 Stockholm, Svante Arrhenius väg 16 C, Sweden

Тел.: +7(8142)57-18-79; факс: +7(8142)76-98-10; e-mail: rabinov@krc.karelia.ru

В настоящей работе использованы методы компьютерного моделирования для исследования свойств углеводородных цепей, входящих в состав молекул фосфолипидов, образующих бислои в жидкокристаллической фазе, а также в невозмущенном состоянии. Сравнение проведено для ряда неразветвленных цепей: насыщенных, содержащих 16 и 18 атомов углерода (16:0, 18:0), а также ненасыщенных, содержащих 18, 20 или 22 атома углерода и от 1 до 6 метиленпрерывающихся *cis*-двойных связей (18:1 ω 9*cis*, 18:2 ω 6*cis*, 18:3 ω 3*cis*, 18:4 ω 3*cis*, 18:5 ω 3*cis*, 20:4 ω 6*cis*, 20:5 ω 3*cis*, 22:6 ω 3*cis*). Моделирование цепей в невозмущенном состоянии проведено методом Монте-Карло (МК). При генерировании конформаций использована существенная выборка по энергии ближних взаимодействий; последняя вычислена в полноатомном приближении с учетом взаимозависимости каждых трех последовательных вдоль по цепи торсионных углов; углы изменяли непрерывно в полном диапазоне (0–360 град). Методом молекулярной динамики (МД) в полноатомном приближении проведено моделирование гомогенных гидратированных бислоев фосфатидилхолинов, содержащих в положении *sn*-1 цепь 16:0 или 18:0, а в положении *sn*-2 – одну из перечисленных ненасыщенных цепей. В обоих вариантах моделирования использовано одно и то же силовое поле, температура $T=303$ К. Вычислен ряд равновесных характеристик, относящихся к каждой углеводородной цепи; в частности, средние расстояния $\langle h \rangle$ между концевыми атомами углерода. Оказалось, что хотя невозмущенное состояние цепей не идентично их состоянию в жидкокристаллических бислоях (величина $\langle h \rangle$ в бислое превышает таковую в свободном невозмущенном состоянии, поскольку один из концов цепи связан с головной группой липида химически, "поджат" цепями соседних молекул и потому более вытянут), относительная разница в $\langle h \rangle$ в двух состояниях сравнительно невелика. Так, для цепей 16:0 и 18:0 она равна ~9–10%, для ненасыщенных цепей с 18 атомами углерода ~11–18%, а для цепи 22:6 ω 3*cis* – приблизительно 23%. Эти величины можно считать оценками степени влияния дальних взаимодействий в цепи, взаимодействий с атомами соседних цепей и с атомами головных групп липидов в бислое по сравнению с влиянием на величину $\langle h \rangle$ только ближних взаимодействий (полностью определяющих состояние невозмущенной цепи). Итак, конформационное поведение цепей фосфолипидов в бислоях по избранному критерию ($\langle h \rangle$) определяется ближними взаимодействиями существенно, на ~77–91%. МК-моделирование углеводородных цепей в невозмущенном состоянии менее трудоемко, чем МД-моделирование бислоев; на основе МК-моделирования проведены расчеты для большого количества вариантов химического строения цепей и выявлены основные соотношения "структура – свойства". В первом приближении, качественно, их можно переносить на соответствующие соотношения для цепей, входящих в состав липидов в бислоях и использовать их для анализа экспериментальных данных, для интерпретации процессов, происходящих в биомембранах.

Работа выполнена при поддержке программы Президента РФ – Ведущие научные школы (НШ-1410.2014.4), гранта Vetenskapsrådet (621-2007-5256).

СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ АНИОННЫХ И КАТИОННЫХ ПРОТОНОФОРОВ НА ПЛОСКИХ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Comparison of the mechanisms of action of anionic and cationic protonophores on the bilayer lipid membranes

Рокицкая Т.И., Антоненко Ю.Н.

НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.40
Тел.: +7(495)939-51-49; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: rokitskaya@genebee.msu.ru

В последнее время переносчики протонов (протонофоры) рассматриваются как средство для предотвращения образования избыточного количества активных форм кислорода в митохондриях (окислительного стресса) посредством ограниченного уменьшения митохондриального потенциала [1]. Используемые в настоящее время протонофоры (DNP, FCCP и другие) являются слабыми кислотами и могут переносить протоны через липидную мембрану в нейтральной форме, а возвращаться обратно в анионной форме. Недавно нами было показано, что катионное производное родамина 19 и пластохинона (SkQR1) обладает разобщающей активностью на митохондриях и клетках [2]. На плоских бислойных липидных мембранах мы изучили механизм действия SkQR1 и его безхинонного аналога (C₁₂R1) с помощью измерения тока после скачка напряжения и диффузионных потенциалов в условиях открытой цепи. Стационарный ток через мембрану линейно зависел от концентрации C₁₂R1, что говорит о функционировании его мономерной формы. При высоких pH, когда родамин в основном депротонирован, ток через мембрану увеличивался мгновенно после прикладывания напряжения и оставался постоянным. При низких pH, напротив, наблюдалось уменьшение тока после прикладывания напряжения из-за перераспределения катионной формы протонофора.

Мы обнаружили, что конъюгаты дикарборана с триазолом и триазолием также обладают протонофорной активностью. Эти соединения, предоставленные нам Ольшевской В.А. и Калининым В.Н. (Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова, РАН), ускорили дыхание и уменьшали потенциал митохондрий, выделенных из печени крысы. В экспериментах на модельных мембранах был изучен механизм действия этих соединений. В частности показано, что модификатор дипольного потенциала мембраны – флоретин – увеличивает ток через БЛМ, индуцированный производным триазолия, и уменьшает ток, индуцированный производным триазола. Полученные результаты позволяют утверждать, что конъюгат дикарборана с триазолом является анионным протонофором, а конъюгат дикарборана с триазолием – катионным.

1. Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov A.A., FEBS Lettres, 1997, vol. 416, pp. 15-18.
2. Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., et al., J. Biol. Chem., 2011, vol. 286, pp. 17831-17840.

ВОДНАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**Membrane water permeability of plant cells under oxidative stress*****Сибгатуллин Т.А., Белова Л.П., Ионенко И.Ф., Великанов Г.А.***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, 420111, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, Россия

e-mail: timsdance@mail.ru

При большинстве стрессовых состояний изменяется проницаемость мембран растительных клеток. Наряду с этим, один из самых ранних ответов при любом биотическом или абиотическом стрессе – это накопление активных форм кислорода (АФК) в клетке. Возникает вопрос, как взаимосвязаны эти эффекты? Исследования трансмембранного переноса воды в растительных клетках сосредоточены в последнее время на роли аквапоринов – интегральных белков, способных регулировать пассивный перенос воды и электронейтральных малых молекул. В регуляцию активности аквапоринов вовлечены различные механизмы, что позволяет аквапоринам участвовать во многих процессах развития растения и его адаптации к изменениям внешней среды.

Цель работы: изучить участие аквапоринов в изменениях водной проницаемости мембран при двух уровнях окислительного стресса.

Проведено исследование суммарной водной проницаемости мембран клетки в условиях окислительного стресса при заведомо различных уровнях АФК. Объектом исследования были корни 5-дневных проростков кукурузы. В качестве индукторов АФК применялось в первом случае – отсечение корня, приводящее к развитию раневого стресса, во втором случае – дополнительно к отсечению использовали паракват. Исследована динамика развития окислительного стресса в течение 6 часов. Основной измеряемый параметр в исследовании – диффузионная водная проницаемость мембран – определялся с помощью метода ЯМР-диффузиометрии. С целью определить вклад аквапоринов в наблюдаемые изменения проницаемости применяли блокатор аквапоринов – хлорид ртути. При обсуждении вопроса о влиянии окислительного стресса и АФК на функциональную активность аквапоринов внимание акцентировано на редокс-статусе тиоловых групп аквапоринов. Для проверки участия тиоловых групп в регуляции проводимости аквапоринов использовали восстановитель дисульфидных связей – дитиотриетол.

В качестве основного показателя для оценки уровня окислительного стресса определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) по содержанию малонового диальдегида. Используемые условия проведения опыта существенно различаются по уровню стресса. Если при раневом стрессе антиоксидантная система, по-видимому, справляется, препятствуя ПОЛ, то во 2-ом случае дополнительное индуцирование АФК приводит к увеличению уровня ПОЛ.

Обнаружено, что увеличение диффузионной водной проницаемости мембран при раневом стрессе обусловлено активацией аквапоринов. При этом проницаемость липидного бислоя с течением времени практически не изменяется. Показано, что основной механизм активации аквапоринов при раневом стрессе заключается в окислении тиоловых групп аквапоринов. При дополнительной индукции АФК с помощью параквата меняется направленность изменения диффузионной проницаемости аквапоринов, что свидетельствует о подключении других – непрямых механизмов их регуляции. Таким образом, направленность изменения диффузионной водной проницаемости мембран зависит от уровня окислительного стресса.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 14-04-31606 и 13-04-01203.

АЛЮМИНИЙ-ИНДУЦИРОВАННОЕ ВОЗРАСТАНИЕ УРОВНЯ АФК В ЭРИТРОЦИТАХ И ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Al-induced ROS increasing in human erythrocytes and lymphocytes in vitro

Скоробогатова А.С., Лукьяненко Л.М., Слобожанина Е.И.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», 220072, Республика Беларусь, Минск, ул. Академическая 27

e-mail: sas.alesya@gmail.com

Алюминий не принадлежит к группе переходных металлов, однако было показано, что в коллоидном растворе молекулы гидроксида алюминия способны связывать переходные металлы, что приводит к активному синтезу АФК [1]. Развитие окислительного стресса при воздействии алюминия может быть связано с нарушением гомеостаза таких эссенциальных элементов как Са, Mg и, что более важно, Fe [2]. В модельных мембранах и клетках мозга крыс ионы алюминия усиливают развитие окислительного стресса, вызванного железом и другими металлами [3, 4].

Нами было предположено, что накопление в клетках крови алюминия может стимулировать окислительные процессы, нарушая баланс «антиоксиданты/прооксиданты». С помощью флуоресцентного зонда 5-(и-6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцентин диацетата (СМ-Н₂DCFDA) было изучено изменение уровня содержания АФК в эритроцитах и лимфоцитах человека, подвергшихся *in vitro* воздействию 20,25 – 40,5 мг/л хлорида алюминия. Обнаружено, что в используемых концентрациях хлорид алюминия вызывает увеличение уровня интенсивности флуоресценции зонда в эритроцитах в течение первых 20 мин на 50-80 % по сравнению с контролем. Аналогичный результат был получен и для лимфоцитов - добавление различных концентраций хлорида алюминия в среду инкубации лимфоцитов приводит к значительному увеличению интенсивности флуоресценции зонда в течение 60 мин. Полученный эффект дозозависим и более выражен в суспензии эритроцитов, что может быть связано с высокой чувствительностью этих клеток к окислительному стрессу.

Нами обнаружено, что 3-х часовая инкубация эритроцитов и лимфоцитов в среде, содержащей хлорид алюминия, приводит к возрастанию уровня в клетках малонового диальдегида (МДА) (максимально на 40 % для эритроцитов и на 33-35 % для лимфоцитов), что отражает нарастание процессов перекисного окисления липидов в клетках.

Для выяснения вопроса о функционировании ферментов антиоксидантной системы в клетках, подвергшихся действию AlCl₃, нами изучены активности СОД, каталазы и глутатионпероксидазы в эритроцитах до и после инкубации их в среде, содержащей хлорид алюминия. В эритроцитах, подвергшихся воздействию 20,25 – 27 мг/л хлорида алюминия обнаружено снижение активности каталазы (73,95±3,55 % и 65,68±3,57 %, соответственно) по сравнению с контролем ($p < 0,05$), небольшое, но достоверное снижение активности СОД и глутатионпероксидазы (на 5-15 %) при воздействии 27 мг/л хлорида алюминия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Полученные результаты позволяют заключить, что токсическое воздействие ионов алюминия на клетки периферической крови может быть связано с генерацией АФК и последующим развитием окислительного стресса, проявляющегося в повышении уровня МДА и снижении активности ферментов антиоксидантной защиты.

1. Bondy, S.C., Guo-Ross, S.X., and Pien, J., *Neurotoxicology*, 1998, vol. 19, pp. 65-71.
2. Kim, Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, vol. 220, pp. 349-56.
3. Menevse, E., et al., *Turk. J. Med. Sci.*, 2006, vol. 36, pp. 279-284.
4. Sanchez-Iglesias, S., et al., *J. Neurochem.*, 2009, vol. 109, pp. 879-888.

ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ABC. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИХ АКТИВНОСТИ**ATP-binding cassette (ABC) transporters. Structural organization and biophysical mechanisms of regulation of their activity**

Слобожанина Е.И., Тамашевский А.В.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», 220072, Республика Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27.

e-mail: Slobozhanina@ibp.org.by

Решение проблемы регуляции активности системы выведения из клетки токсичных соединений необходимо не только для биологии, но и для практической медицины, т.к. формирование множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток – одна из причин неудач химиотерапии. У человека к настоящему времени обнаружено около 50 белков, относящихся к суперсемейству ABC, которые разделены на 8 подсемейств в зависимости от числа и сочетания трансмембранных и АТФ-связывающих доменов. Доменная организация индивидуальных ABC-белков различна. АТФ-связывающие домены всех белков данного семейства имеют 30-40% гомологии, однако при этом транспортные белки обладают необычно широкой субстратной специфичностью. Структурный анализ мультитекарственных транспортеров позволил выдвинуть гипотезу, что белки-переносчики имеют большие гидрофобные сайты связывания и они связывают субстраты скорее всего благодаря комбинации гидрофобного эффекта и электростатического притяжения. Физиологические функции известны пока не для всех белков семейства ABC. Известно, что они не только экспортируют ксенобиотики, но и участвуют в ключевых внутриклеточных процессах, таких как биогенез митохондриальных и цитоплазматических гемсодержащих белков, гомеостаз фосфо- и сфинголипидов, метаболизм холестерина, угнетение апоптоза. Эти белки оказались участниками и ряда патологических процессов у человека. Наиболее изученным из них является Pgp – насос, выкачивающий вещества из клеток, который кодируется геном *MDR1* и способствует формированию МЛУ опухолей человека.

Нами показано, что транспортная активность P-gp и MRP1 в лимфоцитах периферической крови человека зависит от концентрации и латерального распределения холестерина в их мембранах. Причем, активность P-gp лишь частично определяется содержанием холестерина, в то время как функционирование MRP1 в значительной степени зависит от концентрации свободного холестерина в плазматических мембранах лимфоцитов. Установлен характер регуляции функциональной активности P-gp и MRP1 с помощью изменения окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах доноров и пациентов с В-хроническим лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ). Показано, что в интактных клетках как в норме, так и при В-ХЛЛ, увеличение пула АФК активирует, а его снижение – ингибирует активность P-gp и MRP1. При изменении уровня АФК относительно физиологического диапазона в В-лимфоцитах доноров происходит инверсия в характере регуляции активности белков МЛУ. В лейкозных В-клетках P-gp и MRP1 способны сохранять установленный характер регуляции в более широких диапазонах изменения окислительно-восстановительного баланса по сравнению с В-лимфоцитами доноров. Показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса, вызванное воздействием применяемых при терапии В-ХЛЛ лекарственных средств контролирует жизнеспособность лейкозных В-клеток в меньшей степени, чем В-лимфоцитов доноров.

ЭЛЕКТРОГЕННЫЙ ТРАНСПОРТ ИОНОВ НАТРИЯ, КАЛИЯ И ПРОТОНОВ В КАНАЛАХ ДОСТУПА Na,K,АТР-АЗЫ

Electrogenic transport of sodium and potassium ions and protons in access channels of Na,K,АТР-ase

Соколов В.С.1, Ташкин В.С.1, Майорова В.Е.1, Иловайский А. И. 2, Апель Х.Ю.3.

1 – Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 31, Россия

2 – Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

3 – Биологический факультет Университета г. Констанц, 78457 Констанц, Германия

Tel: +7(495)9554585;E-mail: sokolovvs@mail.ru

Na₂,АТР-аза переносит 3 иона натрия из клетки и 2 иона калия – в клетку за счет гидролиза молекулы АТР, поддерживая трансмембранные градиенты этих ионов, необходимые для многих процессов, таких как генерация нервного импульса. Транспорт ионов осуществляется за счет последовательных изменений конформации белка, в результате которых открывается доступ ионов к центрам связывания либо из цитоплазмы (в конформации E1), либо из внеклеточной среды (в конформации E2). Обмен ионов с центрами связывания можно изучать с помощью электрических измерений, что позволяет определить кинетические параметры такого электрогенного транспорта, а также понять устройство каналов доступа, связывающих эти центры с растворами. Несмотря на значительные достижения в исследованиях последнего времени, в которых достаточно подробно был изучен электрогенный транспорт ионов натрия во внеклеточном канале Na₂,АТР-азы [1], ряд аспектов такого транспорта, особенно во внутриклеточном канале, остается невыясненным. В последнее время появились данные о возможной роли протонов в функционировании Na,K,АТР-азы, согласно которым связывание двух ионов натрия или калия сопряжено с депротонированием сайтов белка [2].

Конкурентное связывание ионов натрия и калия и протонов изучалось нами на модельной системе, в которой мембранные фрагменты, содержащие Na⁺,K⁺,АТР-азу, адсорбировались на поверхности бислоидной липидной мембраны. Изменялись малые приращения емкости такой мембраны, вызванные быстрым закислением среды с помощью фотолиза Caged-H⁺ [3,4]. Скачок pH вызывал изменение емкости мембраны и в отсутствие Na,K,АТР-азы, но только в присутствии нативного белка изменение емкости зависело от присутствия ионов натрия и калия в среде. Эффект этих ионов зависел от начального pH, исчезал при ингибировании Na,K,АТР-азы ванадатом, а также в присутствии АТР. Полученные результаты удалось объяснить с помощью модели конкурентного связывания ионов натрия или калия с протонами с внутриклеточной стороны Na,K,АТР-азы. Аппроксимация результатов теоретическими кривыми позволила определить рК центров связывания, а также константы диссоциации ионов натрия и калия. Значения этих констант зависели от наличия в среде ионов магния. Эффект ионов магния объясняется их связыванием в белке, влияющим на его сродство к ионам натрия либо за счет изменения конформации, либо за счет появления электростатических полей у центров связывания ионов.

Выполнено при финансовой поддержке проекта РФФИ № 13-04-01624.

1. Gadsby, D.C., Bezanilla, F., et al., Nat. Commun, 2012, vol. 3, p. 669.
2. Apell, H.J., Benz, G., and Sauerbrunn, D., Biochemistry, 2011, vol. 50, pp. 409-418.
3. Ташкин, В.Ю., Щербачев, А.А., и др., Биологические мембраны, 2013, т. 30, сс. 105-114.
4. Ташкин, В.Ю., Гаврильчик, А.Н., и др., Биологические мембраны, 2015, т. 32, сс. 110-118.

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ТОКИ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ NMDA РЕЦЕПТОРАМИ РАЗЛИЧНОГО СУБЪЕДИНИЧНОГО СОСТАВА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫС**Transmembrane currents mediated by NMDA receptors with various subunit compositions in rat cerebellar neuronal primary culture****Степаненко Ю.Д., Карелина Т.В., Абушик П.А., Антонов С.М., Сибаров Д.А.**

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

194223, Санкт-Петербург, пр. Тореца 44 Тел.: +7(812)552-85-54; факс: +7(812)552-30-12; e-mail: moorl@rambler.ru

Трансмембранные ионные токи, опосредуемые ионотропными рецепторами глутамата NMDA (N-метил-D-аспартат) типа (NMDARs), участвуют в синаптической пластичности и играют важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Субъединичный состав NMDARs определяет амплитуду и длительность ионного тока, опосредуемого рецептором. Так, например, GluN2 субъединицы, входящие в состав NMDARs, имеют разную скорость десенситизации, ионную проводимость и чувствительность к Mg⁺ блоку. На сегодняшний день имеются данные о трансмембранных токах, опосредованных NMDARs различного субъединичного состава в первичных культурах нейронов гиппокампа и коры, однако первичная культура мозжечка остается малоисследованной областью. В связи с этим, целью нашего исследования являлась оценка вклада NMDARs различного субъединичного состава в генерацию трансмембранных токов клеток в первичной культуре нейронов мозжечка крыс методом локальной фиксации потенциала в конфигурации "целая клетка". Для выявления вклада субъединиц NMDARs, опосредующих трансмембранные токи в первичной культуре нейронов мозжечка, в электрофизиологических экспериментах совместно с агонистом – NMDA (30 мкМ, и ко-агонистом NMDARs – глицином 30 мкМ), апплицировались избирательные блокаторы GluN2B субъединицы (1 мкМ ифенпродил) и GluN2C/D субъединиц (100 мкМ QNZ46). Результаты исследования показали, что у большинства клеток совместная аппликация NMDA и ингибитора GluN2C/D субъединицы QNZ46 вызывала ингибирование токов на $41,1 \pm 9,3\%$, а NMDA и ифенпродила – на $47,0 \pm 9,4\%$. Поскольку GluN2C/2D содержащие NMDARs имеют более низкую ионную проводимость по сравнению с рецепторами, содержащими GluN2B, а доля тока, опосредуемого GluN2C/2D и GluN2B субъединицами примерно одинакова, можно предположить, что экспрессия GluN2C/D субъединиц в нейронах первичной культуры мозжечка превышает экспрессию GluN2B. У 8% исследованных нейронов ифенпродил полностью подавлял токи, вызванные агонистом, а QNZ46 не оказывал на них никакого влияния. В 2% нейронов было зарегистрировано полное подавление тока QNZ46 и отсутствие реакции на ифенпродил. На большинстве нейронов (>90%) при совместном применении антагонистов, остаточный ток составлял 24-25% и, вероятнее всего, был опосредован GluN2A-содержащими NMDARs. Степень ингибирования токов целой клетки при совместной аппликации блокаторов была меньше, чем арифметическая сумма степени ингибирования токов ифенпродилом и QNZ46 при отдельной аппликации, что косвенно свидетельствует в пользу экспрессии тригетеромерных GluN1/GluN2B/GluN2C NMDARs. Таким образом, для большинства нейронов в первичной культуре мозжечка на DIV7 трансмембранные токи опосредуются NMDARs смешанного субъединичного состава, однако присутствуют редкие нейроны, трансмембранные токи у которых опосредуются исключительно GluN2B и GluN2C/D субъединицами NMDARs. Субъединичный состав NMDARs нейронов первичной культуры мозжечка отличается от субъединичного состава первичной культуры нейронов коры, в которых трансмембранные токи опосредуются преимущественно GluN2B субъединицей.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-00227, 14-04-31707 и 15-04-08283.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ГОЛУБЯ

Effect of calcium ions on phospholipid composition of erythrocyte membranes of pigeon

Сюсин И.В.1, Девяткин А.А.1, Ревин В.В.1

1 – Факультет Биотехнологии и Биологии ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарёва», 430005, Саранск, ул. Большевистская, 68

Тел.: +7(917)990-08-06e-mail: ilya.sysin@gmail.com

Известно, что физико-химические свойства мембран эритроцитов – микровязкость, деформируемость, осмотическая резистентность зависят от состава липидов [1]. Предполагается, что ключевую роль в изменении состава липидов выполняют ионы Ca^{2+} , являющиеся ответственными за проявления активности ферментов и в первую очередь фосфолипаз [2].

Вместе с тем до настоящего времени не изучено влияние высоких концентраций Ca^{2+} на состав основных фосфолипидов, участвующих в формировании мембран эритроцитов.

В связи с этим целью нашей работы было исследование влияния повышенных концентраций ионов Ca^{2+} на фосфолипидный состав мембран эритроцитов голубя.

Эритроциты получали путем центрифугирования цельной крови при 1500g. Нагрузку эритроцитов ионами Ca^{2+} проводили путем выдерживания эритроцитов в среде содержащей 3,5 мМ CaCl_2 . Инкубацию вели при температуре 40 °С.

Увеличение концентрации кальция в среде инкубирования приводит к изменениям во всех фракциях фосфолипидов. Нами установлено, что содержание лизофосфатидилхолина и сфингомиелина возрастает. Наибольшее накопление зарегистрировано во фракции лизофосфатидилхолина (превышение над уровнем контроля составило 38%).

Одновременно происходит снижение содержания фракций фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола. В наибольшей степени уменьшается количество фосфатидилинозитола. После 30 минутного воздействия ионов Ca^{2+} количество фосфатидилинозитола снижалось на 43%.

Таким образом, обнаруженные нами изменения в составе фосфолипидов свидетельствуют о том, что ионы Ca^{2+} могут являться одним из механизмов регуляции состояния эритроцитарных мембран.

1. Oliveira, S. and Saldanha, C., Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2010, vol. 44, pp. 63-74.
2. Васильева, Е.М., Биомедицинская химия, 2005, т. 51, вып. 2, сс. 118-126.

**ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОРЕЛЬЕФА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЦЕРАМИДАМИ****Alteration in surface microrelief of erythrocyte membranes modified by ceramides****Филимоненко Д.С.¹, Петрович В.А.², Белевич Е.И.², Козлова Н.М.², Слобожанина Е.И.²**

1 – ГНУ «Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси», 220072, Минск, пр. Независимости, 68; 2 – ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», 220072, Минск, ул Академическая, 27
e-mail: Catherina_Bel_@tut.by

Известно, что к запуску эритроцитоза могут приводить окислительный стресс, осмотический шок, истощение клеток по АТФ, а также воздействия различного рода ксенобиотиков на эритроциты [1]. Одним из механизмов, инициирующих эритроцитоз является повышение концентрации церамида, участвующего в процессах апоптоза и некроза в различных типах ядерных клеток [2-4]. В эритроцитах церамид образуется при расщеплении сфингомиелина ферментом сфингомиелиназой. Перераспределение фосфолипидов в эритроцитарной мембране, наблюдаемое при осмотическом шоке, воспроизводилось добавлением C_6 - и C_{16} -церамида [5]. Однако механизмы, лежащие в основе развития церамид-индуцированного эритроцитоза, остаются не ясными. Известно, что в ядерных клетках церамид приводит к кластеризации цитокиновых рецепторов в липидных рафтах и к формированию «смерть-индуцирующих сигнальных комплексов», а также к изменению топографии поверхности клеточной мембраны. Церамид способен изменять взаимодействие мембраны с цитоскелетом, приводить к везикуляции мембраны, к увеличению ее жесткости и проницаемости [2].

Цель работы – с помощью атомно-силовая микроскопии (АСМ) выяснить влияют ли церамиды на изменение топографии поверхности мембран эритроцитов.

В работе использована кровь доноров. Суспензию эритроцитов инкубировали с 50 мкМ C_2 - (N-ацетил-D-сфингозин) или C_6 - церамида (N-гексаноил-D-сфингозин) при 37°C 4 ч. Для количественной оценки изменения топографии поверхности эритроцитов была рассчитана автокорреляционная функция профиля поверхности и ее параметр – длина корреляции r_l , которая рассчитывается по дискретным значениям реализаций АСМ и является информативным параметром для оценки степени модификации поверхности эритроцитов [6].

Установлено, что обработка эритроцитов C_2 -церамидом приводила к заметному увеличению длины корреляции r_l , в сравнении с контрольными образцами, в то время как после инкубации эритроцитов с C_6 -церамидом рост величины r_l оказался незначительным. Так, для контрольных образцов длина корреляции составляла 157 нм, а для эритроцитов, модифицированных C_2 -церамидом и C_6 -церамидом, 215 и 169 нм соответственно.

Поскольку увеличение r_l отражает уменьшение числа и величины «шероховатостей» на поверхности мембраны модифицированных эритроцитов, можно сделать вывод о том, что воздействие C_6 -церамида на эритроциты в исследуемой концентрации не приводит к существенному изменению «шероховатости» мембраны эритроцита, в то время как обработка C_2 -церамидом приводит к изменению микрорельефа поверхности эритроцитарной мембраны.

1. Белевич, Е.И., и др., Успехи современной биологии, 2014, т. 134, №2, сс. 149-157.
2. Lang, E., et al., Apoptosis, 2015, vol. 20, pp. 758-767.
3. Mimeault, M., FEBS Lett., 2002, vol. 530, pp. 9-16.
4. Prinetti, A., et al., J. Biol. Chem., 2003, vol. 278, pp. 5574-5583.
5. Lang, K.S., et al., Cell Death and Differentiation, 2004, vol. 11, pp. 231-243.
6. Хайрулина, А.Я., и др., Оптика и спектроскопия, 2008, т. 105, сс. 168-175.

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАНЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ ЦИТОХРОМОМ С В ПРИСУТСТВИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Effect of membrane lipid composition on the ion channel formation by cytochrome c in the presence of hydrogen peroxide

Фирсов А.М., Котова Е.А., Антоненко Ю.Н.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.40
Тел.: +7(495)939-51-49; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: amfamf@yandex.ru

Цитохром С – низкомолекулярный гем-содержащий белок, выполняющий целый ряд важных функций в клетках млекопитающих. Основной функцией цитохрома с принято считать перенос электрона от убихинона цитохром с-редуктазы (комплекс III) дыхательной цепи митохондрий на цитохром с-оксидазу (комплекс IV) дыхательной цепи митохондрий. Общеизвестной в настоящее время является также ключевая роль цитохрома с в апоптозе, обусловленная выходом этого белка из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль, где цитохром с взаимодействует с белком Араф-1, что приводит к образованию апоптосом и запуску каспазо-зависимого апоптоза.

В последние годы в литературе рассматривается участие этого белка в процессе перекисного окисления липидов во внутренней мембране митохондрий. В частности было показано, что в ряде условий происходит окислительная модификация цитохрома с и белок становится активной пероксидазой, способной участвовать в процессе перекисного окисления липидов, в частности кардиолипина, к которому цитохром с имеет большое сродство [1]. В нашей недавней работе [2] было показано, что под действием цитохрома с в присутствии перекиси водорода происходит нарушение барьерных свойств бислойных липидных мембран, которые начинают пропускать такие красители как карбоксифлуоресцеин и сульфородамин В. Эти данные, а также результаты работ Осипова с соавт.[3] и Антонова с соавт.[4] по влиянию комбинации цитохрома с с перекисью водорода на интегральную проводимость плоских бислойных липидных мембран позволяют предположить, что цитохром с в условиях окислительного стресса способен формировать в мембранах поры, проницаемые для ионов, т.е. ионные каналы. Нами было изучено влияние липидного состава мембраны на активность ионных каналов, образуемых цитохромом с в плоской бислойной мембране в присутствии перекиси водорода. Было показано, что в мембранах, содержащих природный кардиолипин из сердца лошади, цитохром с индуцировал каналы с большей амплитудой по сравнению с мембранами, содержащими синтетический тетраолеил-кардиолипин. В отсутствие кардиолипина каналы не образовывались. В мембранах из диленолеилфосфатидилхолина и диэрукаилфосфатидилхолина, содержащих кардиолипин, формирование ионных каналов было подавлено. Индукция ионных каналов подавлялась также антиоксидантами, такими как тролокс.

1. Vladimirov, Y.A., Proskurnina, E.V., and Alekseev, A.V., *Biochemistry (Moscow)*, 2013, vol. 78, no. 10, pp. 1086-97.
2. Firsov, A.M., Kotova, E.A., Korepanova, E.A., Osipov, A.N., and Antonenko, Y.N., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, vol. 1848, no. 3, pp. 767-74.
3. Puchkov, M.N., Vassarais, R.A., Korepanova, E.A., and Osipov, A.N., *Biochim. Biophys. Acta.*, 2013, vol. 1828, no. 2, pp. 208-12.
4. Antonov, V.F., Puchkov, M.N., Korepanova, E.A., Nemchenko, O.Y., and Borodulin, V., *Eur. Biophys. J.*, 2014, vol. 43, nos. 10-11, pp. 469-76.

ГРАМИЦИДИНОВЫЕ КАНАЛЫ КАК СЕНСОРЫ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА БИСЛОЙНУЮ ЛИПИДНУЮ МЕМБРАНУ

Gramicidin channels as sensors of external actions on the membrane

Хамицаев А.К., Адельянов А.М., Ожередов В.А.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.2

Одной из важных задач биофизики клетки является диагностика состояния клетки и прогнозирование его изменений при различных внешних воздействиях. Изменение состояния клетки практически всегда связано с изменением состояния клеточной мембраны, поэтому важно установить корреляции между внешними воздействиями и состоянием липидного бислоя мембраны. В качестве сенсора, чувствительного к изменениям состояния липидного бислоя предлагается использовать ансамбль грамицидиновых каналов, встроенных в искусственную бислойную липидную мембрану (БЛМ). В связи с этим возникает задача классификации состояний ансамбля каналов в БЛМ, для решения которой обычно используют статистические характеристики изменений проводимости БЛМ со временем. Однако такой подход хорош при явном изменении средних значений проводимости, но требует сравнительно больших затрат времени для более или менее точного определения момента разладки системы.

В настоящей работе для анализа нестационарных временных рядов, представляющих собой записи токов через БЛМ при различных разностях потенциалов, применена, специально сконструированная в пакете Matlab, нейронная сеть, а также для сравнения результатов применена стандартная нейронная сеть, представляющая собой перцептрон, используемый в задачах распознавания образов. В отличие от стандартных нейронных сетей пакета Matlab, разработанная сеть позволяет избегать застревания в локальных минимумах, а также существенно уменьшить время поиска момента разладки системы, при достаточно высокой точности распознавания состояний системы. Кроме того, время, требуемое для ее обучения, составляет 23 с при ошибках первого и второго рода 16% и 12%, соответственно, что значительно меньше времени обучения стандартной нейронной сети (19 мин) для выполнения такой же задачи.

В качестве внешнего воздействия был использован противовирусный препарат «Панавир», механизм действия которого предположительно связан с влиянием на состояние липидного бислоя мембраны. Изменение характеристик проводимости БЛМ со встроенными грамицидиновыми каналами при добавлении панавира отчетливо фиксируется при его доли в омываемом растворе более 0,2% и практически не зависит от трансмембранной разности потенциалов. При концентрациях ниже этого порогового уровня действие препарата также прослеживается, но точность классификации становится существенно ниже.

Предложенный метод классификации состояний системы может быть использован в различных задачах, где требуется определить момент разладки системы и изменение ее состояния, например, при разработке лекарств, диагностике заболеваний и прогнозе их развития.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СВОБОДНЫХ И КОВАЛЕНТНО ПРИВЫТЫХ К НОСИТЕЛЮ МОЛЕКУЛ ПОЛИКАТИОННЫХ ФТАЛОЦИАНИНОВ С ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ ГРАМ-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Study of binding of free and immobilized by covalent binding on silica gel substituted policationic metallophthalocyanines to lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria

Холина Е.Г.1, Страховская М.Г.1, Нестеренко А.М.1,3, Коваленко И.Б.1,2, Зленко Д.В.1

1 – Биологический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп.12

2 – Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28

3 – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ, 119992, Москва, Ленинские горы, 1 Тел.: +7 (495) 939-02-89; e-mail: tenarra@mail.ru

Появление резистентных к антибиотикам форм патогенных бактерий привело в последние десятилетия к резкому увеличению числа заболеваний бактериальной природы. У грам-отрицательных бактерий основным компонентом клеточной стенки являются молекулы липополисахаридов (ЛПС), которые, попадая в кровь, могут вызывать сепсис.

Поликатионные металлофталоцианины (Фц) обладают высоким сродством и фотодинамической активностью в отношении ряда патогенных грамотрицательных бактерий. Учитывая широкие вариации в строении ЛПС, важной задачей является исследование тропности Фц к этим поверхностным структурам микробной клетки. Для изучения эффективности связывания ЛПС клеточных стенок грам-отрицательных бактерий с ковалентно привитыми к силикагелю Фц использовали ЛАЛ-тест. Оказалось, что среди привитых к силикагелю молекулы Фц $ZnPc8+$ наиболее эффективно связывают молекулы ЛПС из растворов неорганических солей.

Для изучения связывающей активности свободных молекул Рс оценивалось значение дзета потенциала образуемых ЛПС в растворе мицелл и липосом со встроенными в них ЛПС в зависимости от добавления различных концентраций Рс. Для изучения связывания мицелл были использованы мутантные формы ЛПС с различной длиной коровой части. В результате ряда экспериментов было выяснено, что свободные молекулы $ZnPc8+$ вызывают нейтрализацию дзета потенциала мицелл ЛПС и липосом из дифосфатидилхолина со встроенными молекулами ЛПС, то есть связываются с этими структурами по электростатическому механизму. Эффект нейтрализации дзета потенциала наиболее выражен у мицелл из Re-формы ЛПС, обладающих минимальной структурой коровой части.

С целью провести в последующем компьютерное моделирование связывания молекул ЛПС и Фц нами была построена компьютерная модель молекулы $ZnPc8+$. В силу особенностей синтеза образец $ZnPc8+$ представляет собой смесь изомеров с различным положением заместителей в макроциклическом ядре. Поэтому для построения модели нами были оценены наиболее вероятные позиции остатков холина в молекуле, для чего мы рассчитали вероятности последовательного электрофильного присоединения заряженных остатков к макроциклическому ядру при помощи функций Фукуи.

На основе функций Фукуи, а также на основе стерических соображений, нами были предложены три варианта молекулы, которые могут быть представлены в смеси изомеров. Для каждой из этих молекул была построена топология, включающая оптимизацию геометрии молекулы в базе $ss-pVDZ$ в рамках теории функционала плотности (DFT) с трехпараметрическим потенциалом $B3LYP5$ и расчет парциальных зарядов. Квантово-механические расчеты были выполнены с помощью программного пакета Firefly, расчет точечных зарядов на атомах был произведен на основе алгоритма RESP.

РОЛЬ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЁМА ГЛАВНЫХ КЛЕТОК СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОК ПОЧКИ КРЫСЫ**Role of organic anions in the volume regulation in the principal cells of kidney collecting ducts**

Цымпилов В.С., Батурина Г.С., Каткова Л.Е., Соленов Е.И.

ИЦиГ СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, 10.

тел.: +7(383) 363-49-63*4123, факс.:+7(383) 333-12-78, e-mail: tsympilov@bionet.nsc.ru.

Почка является основным эффекторным органом поддержания осмотического и ионного гомеостаза у млекопитающих. Главные клетки собирательных трубок наружного мозгового вещества почки находятся в постоянном контакте с канальцевой жидкостью, осмотическое давление которой изменяется в широких пределах. Они имеют эффективные механизмы поддержания осмотического гомеостаза, чтобы функционировать в условиях изменяющегося осмотического давления среды. При набухании главные клетки развивают реакцию RVD (регуляторное уменьшение объёма), в основе которой лежит выведение из клетки осмотически активных ионов и воды.

Ранее в нашей группе была разработана математическая модель, представляющая собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений. Анализ этой модели предположил значительную роль органических анионов на динамику процесса RVD и величину объёма клетки в целом [1]. Задачей настоящего исследования было исследовать роль органических анионов в регуляции клеточного объёма.

В работе использовали фрагменты собирательных трубок наружного мозгового вещества почек крысы, полученные методом микродиссекции. Изменения объёма определяли с помощью флуоресцентного метода, основанного на гашении кальцеина белками цитоплазмы [2]. Транспорт органических анионов блокировали пробенецидом (300 ± 50 μM). Скорость процесса оценивали по коэффициенту регрессии графика относительной флуоресценции кальцеина.

Пробенецид достоверно снижает скорость набухания клеток в гипотонической среде, что отражается на коэффициентах регрессии относительной флуоресценции кальцеина (контроль $0,40 \pm 0,05$; опыт $0,07 \pm 0,02$; $p \leq 0,01$, $n=6$). Пробенецид снижает интенсивность процесса RVD (коэффициенты регрессии относительной флуоресценции кальцеина: контроль $-0,075 \pm 0,014$; опыт $-0,009 \pm 0,003$; $p \leq 0,01$, $n=6$). Во время реакции RVD клетка выводит осмотически активные ионы, в результате чего относительная флуоресценция после гипотонического шока ниже, чем до него. Пробенецид снижает потерю органических осмолитов во время реакции RVD, о чем свидетельствует разница в относительной флуоресценции до и после гипотонического шока (контроль $17,83 \pm 1,05\%$; опыт $1,8 \pm 0,37\%$; $p \leq 0,001$, $n=6$). По результатам исследования сделано заключение о значительной роли пробенецид-зависимых транспортеров органических анионов в механизме поддержания осмотического гомеостаза главных клеток собирательных трубок.

1. Zarogiannis, S.G., Ilyaskin, A.V., Baturina, G.S., Katkova, L.E., Medvedev, D.A., Karpov, D.I., Ershov, A.P., and Solenov, E.I., Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypo-osmotic shocks, *Math. Biosci.*, 2013, vol. 244, pp. 176-187.
2. Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G.T., and Verkman, A.S., Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, vol. 286, pp. 426-432.

РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА В ТРАНСМЕМБРАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ: НОВЫЕ ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

Role of cytoskeleton in transmembrane signaling: new facts and hypothesis

Шаронов Г.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, 31/5
Тел.: +7(905)5407565; e-mail: sharonov@gmail.com

С развитием инструментальных методов в последние 10 лет были получены данные, которые заставляют существенно пересмотреть механизмы передачи сигнала через плазматическую мембрану (ПМ). В современном представлении передача сигнала на ПМ происходит по средствам динамических нанокластеров размером около 100 нм, состоящих из десятков различных рецепторов и внутриклеточных ферментов (эффекторов), которые активируются по принципу «все или ничего». Такая схема позволяет в десятки раз повысить чувствительность за счет фильтрации шума, вызванного флуктуациями одиночных рецепторов. Кластеры сформированы в отсутствие внешних стимулов и связаны с цитоскелетом. Механизм переключения кластера в активное состояние при связывании лиганда непонятен. Ряд данных указывает на то, что взаимодействие с цитоскелетом и его перестройка играют определяющее значение для активации. Во-первых, после активации многих рецепторов происходит их концентрирование в отдельных нанокластерах в области активации, которое возможно благодаря временному ослаблению связи рецептора с цитоскелетом и повышению его подвижности. Во-вторых, активация всегда вызывает слипание кластеров без смешения их содержимого, что указывает на сокращение примембранного цитоскелета. Однако не ясно, является ли слипание причиной или следствием активации. Возможно, что оно является следствием увеличения жесткости цитоскелета, которое необходимо для стабилизации рецепторного комплекса и осуществления ферментативных реакций эффекторами. Также непонятен и механизм активации сокращения цитоскелета. Одними из вероятных регуляторов этого процесса являются гликозилфосфатидилинозит-заякоренные белки (ГФИ-Б), которые связаны с короткими (~200 нм) и подвижными актиновыми филаментами посредством белок-липидных взаимодействий. Привлечение ГФИ-Б в область активации вызывает выравнивание связанных с ними актиновых филаментов, их спонтанное натяжение за счёт связанного миозина и созревание в стабильные филаменты. Это может обеспечивать необходимую жесткость цитоскелета в основании рецепторного кластера или создавать области фокусировки рецепторных кластеров.

АКТИВАЦИЯ P2X7 РЕЦЕПТОРОВ ИНДУЦИРУЕТ АПОПТОЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**P2X7 receptors activation induces in human erythrocyte apoptosis**

Шереметьев Ю.А., Rogozin M.M., Поповичева А.Н., Левин Г.Я.

ФГБУ Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, МЗ РФ, 603155, Нижний Новгород, Верхневолжская наб. 18/1

Тел.: +8 (831)436-21-80; Факс: +8(831)432-21-58; e-mail: ya.sher@rambler.ru

Изучена роль активации пуринергических P2X7 рецепторов в развитии апоптоза эритроцитов человека. Активацию рецепторов проводили с помощью внеклеточного АТФ в финальных концентрациях от 1 до 5 мМ. Влияние АТФ на эритроциты изучали в инкубационной среде не содержащей ионы кальция, в присутствии глюкозы. Эритроциты инкубировали с АТФ при 37⁰С в течение 24 ч. Изучали экстернализацию фосфатидилсерина и образование микрочастиц, морфологию клеток, деформацию эритроцитов при высоком напряжении сдвига, метгемоглобин. Экстернализацию фосфатидилсерина определяли с помощью проточного цитофлуориметра и аннексина V. Микрочастицы выделяли из супернатанта с помощью гадолиния. В осадке определяли активность маркерного фермента микрочастиц ацетилхолинэстеразу и общий белок. Метгемоглобин изучали спектрофотометрическим методом. Показано, что активация P2X7 рецепторов стимулирует образование метгемоглобина в эритроцитах и экстернализацию фосфатидилсерина при финальной концентрации 1 мМ. Образуется большое количество микрочастиц, обладающих высокой ацетилхолинэстеразной активностью. При финальной концентрации 1 мМ эритроциты имеют эхиноцитарную форму, при 2 мМ эритроциты приобретают сферостоматоцитарную форму. При этом нарушается деформация эритроцитов. При концентрации 2 мМ эритроциты практически полностью теряют способность деформироваться (вытягиваться в эллипсы) в сдвиговом потоке. При финальной концентрации 3 мМ и выше эритроциты выпадают в осадок с образованием большого количества метгемоглобина. Микроскопическая картина показывает, что высокие концентрации АТФ вызывают образование больших пустых клеток, склеенных между собой. По-видимому, при финальных концентрациях АТФ выше 3 мМ происходит процесс некроза клеток. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при финальных концентрациях АТФ в 1 и 2 мМ происходит выраженный эриптоз, что свидетельствует о важной роли пуринергических рецепторов в развитии апоптоза эритроцитов человека.

ЛИПИДЫ И ЭВОЛЮЦИЯ ХИРАЛЬНОЙ АСИММЕТРИИ

Lipids and evolution of the chiral asymmetry

Яковенко Л.В., Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, физический факультет,
119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.2

Тел.: +7(495)939-30-07; e-mail: leo.yakovenko@mail.ru

При рассмотрении эволюции предбиологических и биологических систем липидам обычно отводилась роль относительно пассивного матрикса в составе мембранных структур. Главными участниками эволюционного процесса считались белки и нуклеиновые кислоты. Однако в последнее время стало ясно, что липиды могли быть одним из ключевых участников эволюции и, возможно, были тем биохимическим усилителем, который обеспечил сегрегацию биомолекул по признаку хиральности и бифуркационный переход к хирально асимметричным биологическим системам.

Абиогенный синтез амфифильных соединений в условиях первобытной Земли протекает гораздо быстрее синтеза аминокислот и нуклеиновых оснований, поэтому можно полагать, что в древнем океане липиды преобладали над другими классами соединений и по количеству, и по разнообразию. Первые липиды были, конечно, существенно проще устроены, чем современные, но обладали теми же физико-химическими свойствами, в частности, были способны спонтанно образовывать различные структуры: мицеллы, везикулы, бислои, ламеллярные структуры и т.п. Свойства этих структур определяются их составом. Количество вариантов состава чрезвычайно велико, поэтому и разнообразие липидных структур с разными физико-химическими свойствами практически безгранично. Мицеллы и везикулы в «первичном бульоне» появились задолго до первых пептидов и нуклеиновых кислот, но они уже обладали некоторыми свойствами, сходными со свойствами репликаторов Эйгена, и могли образовывать «нечеткие» гиперциклы. При этом наследуемой информацией была композиция амфифильного репликатора.

Известно, что в определенных условиях ансамбли молекул амфифилов без ковалентных связей, например, везикулы, помимо обмена молекулами с окружающей средой, способны к слиянию и делению. При делении состав дочерней везикулы зависит от состава исходной, причем образование новых везикул при росте и последующем делении существующих происходит по «нечеткому» (размытому) взаимно автокаталитическому механизму. Моделирование таких систем показало, что у них есть относительно устойчивые (гомеостатические) и неустойчивые состояния, определяемые составом.

Первичные везикулы можно рассматривать как предшественники клетки. Мембраны везикул могли быть образованы сначала простыми амфифилами, но они были нестабильными, поэтому постепенно такие везикулы были вытеснены более стабильными, имеющими мембраны из более сложных липидов, таких как фосфолипиды. Фосфолипиды хиральны, они могут содержать глицеро-1-фосфат или глицеро-3-фосфат. При абиогенном синтезе в отсутствие хиральных катализаторов оба энантиомера образуются в равных количествах, поэтому мембраны предшественников клеток были гетерохиральными по липидам. Гетерохиральные мембраны менее стабильны, чем гомохиральные, и дальнейший отбор по стабильности привел к появлению двух типов гомохиральных мембран, а затем и к разделению линии предшественников клетки на две ветви, давшие начало археям и бактериям с мембранами, имеющими в полярных частях хиральные антиподы глицерофосфатов без известных исключений.

**Биологическая подвижность.
Молекулярные моторы**

АНАЛИЗ КОЛЕБАТЕЛЬНОГО ДВИЖЕНИЯ ЭНДОПЛАЗМЫ МИКСОМИЦЕТА *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Oscillating movement of *Physarum polycephalum* myxomycete analysis

Авсиевич Т.И., Фролов С.В., Проскурин С.Г.

Тамбовский государственный технический университет, кафедра Биомедицинская техника, 392000, Тамбов, ул. Мичуринская 112 Д

Тел.: +7 (4752) 63-56-20; e-mail: tavsievich.tamb.ru

Биологическая подвижность часто носит колебательный характер, который задается клеточными осцилляторами. Однако выявление этих осцилляторов и определение принципов их функционирования является сложной задачей. Целью настоящей работы является исследование колебательной, знакопеременной подвижности эндоплазмы в изолированном тяже плазмодия *Physarum polycephalum* при воздействии ингибиторов клеточного дыхания цианида калия (KCN) и салицилгидроксамовой кислоты (SHAM).

Многоядерная клетка миксомицета *Physarum polycephalum* с ярко выраженным амебидным характером движения является классическим объектом для исследования немышечной подвижности [1]. Периодические сокращения эндоплазмы, обусловленные взаимодействием актина с миозином, вызывают возвратно-поступательное движение эндоплазмы. Таким образом, активность движения определяется наличием молекул аденозинтрифосфата (АТФ), и окислительным фосфорилированием. Для остановки движения применяются ингибиторы клеточного дыхания KCN и SHAM, блокирующие процессы выделения энергии.

Тяж плазмодия вырезался из целого организма и помещался в буферный раствор солей, после чего при помощи знакочувствительного лазерного доплеровского микроскопа неинвазивно осуществлялась регистрация скорости движения эндоплазмы от времени, $V(t)$, в тяже плазмодия [2]. После обработки тяжа ингибиторами дыхания, приводящей к полной остановке движения, зависимости $V(t)$ регистрировали вновь. Полученные временные зависимости обрабатывались с помощью оконного преобразования Фурье в пакете Matlab. Обработка позволила получить частотные спектры, на которых отчетливо выделялись два основных пика ω_1 и ω_2 с максимальными амплитудами, как в случае для тяжа в буферном растворе, так и после обработки тяжа ингибиторами. Частоты для каждой серии экспериментов оставались неизменными, менялись только амплитудные характеристики, так, при воздействии ингибиторов амплитуда первого пика уменьшалась, а второй пик исчезал, но спустя некоторое время после удаления ингибиторов, амплитуды пиков восстанавливались до первоначальных значений. Несмотря на то, что значения частот могут меняться, в каждом зарегистрированном случае они равноудалены и их отношение $\omega_2/\omega_1=2$ с точностью 2%.

Очевидно, что количество обнаруженных гармоник соответствует числу внутренних осцилляторов, обуславливающих сократительную подвижность плазмодия. С учетом найденных при помощи преобразования Фурье спектральных характеристик, была построена модель исходных зависимостей $V(t)$, показавшая хорошую степень корреляции с экспериментальными данными ($R^2=0.92$).

1. Теплов, В.А., Митрофанов, В.В., и Романовский, Ю.М., Биофизика, 2005, т. 50, №4, сс. 704-712.
2. Проскурин, С.Г. и Авсиевич, Т.И., Биофизика, 2014, т. 59, №6, сс. 1143-1150.

ВЛИЯНИЕ РЕАЛЬНОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА БЕЛКИ САРКОМЕРНОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦ ГРЫЗУНОВ**Influence of real microgravity on sarcomeric cytoskeleton proteins and heat shock proteins of striated muscle of rodents**

Вихлянцев И.М., Подлубная З.А.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская область, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)739-334; факс: +7(4967)33-05-53; e-mail: vikhlyantsev@mail.ru

Исследованы изменения изоформного состава, содержания, степени фосфорилирования и экспрессии генов гигантских белков саркомерного цитоскелета тайтина (титина) и небулина, а также изменения генной экспрессии и содержания белков теплового шока (Hsp70 и Hsp90) в поперечно-полосатых мышцах монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) и мышей C57BL/6N после 12-суточного («Фотон-М» №3) и 30-суточного («БИОН-М1») космических полетов. В условиях реальной микрогравитации обнаружено снижение содержания тайтина и небулина в атрофированных скелетных мышцах грызунов, что сопровождалось увеличением уровня фосфорилирования тайтина и изменением экспрессии генов гигантских белков. Не выявлено изменений в экспрессии гена и содержании Hsp90 в поперечно-полосатых мышцах мышей после 30-суточного космического полета, однако зарегистрировано значительное (в 2,35 раза, $p \leq 0,01$) снижение содержания Hsp70 при увеличении (в 5,2 раза, $p \leq 0,01$) экспрессии гена этого белка в атрофированной икроножной мышце мышей группы «Полет». Сделано заключение о негативном характере снижения содержания исследуемых белков и увеличения уровня фосфорилирования тайтина в скелетных мышцах грызунов.

Выражаем благодарность сотрудникам ГНЦ РФ–ИМБП РАН (Москва) и ОАО «РКЦ Прогресс» за подготовку и проведение экспериментов по проектам «Фотон-М» №3 и «БИОН-М1».

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-00281, 14-04-00112, 14-04-92116 и 14-04-32240.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ МИОМОДУЛИНОВ

Structure-functional organization of the myomodulin molecules

Годжаев Н.М., Агаева Л.Н.

Университет Кавказ, AZ0101, Шоссе Баку-Сумгаит, 16 км. Хырдалан-Баку/Азербайджан

e-mail: leylanamig@mail.ru

Проблема структурной организации пептидов включает в себя две противоположные по постановке задачи. Первая из них, так называемая прямая структурная задача, связана с установлением пространственного строения и конформационных, динамических свойств пептидной молекулы по известной аминокислотной последовательности. Вторая из них, так называемая обратная структурная задача, состоит в целенаправленном конструировании химического строения молекулы, по заранее заданной пространственной структуре.

При создании синтетических аналогов природной молекулы возникают три основные проблемы: 1) пептид должен быть стабильным в биологических средах, 2) он должен взаимодействовать со специфическими рецепторами, 3) препарат должен проникать к своим клеткам-мишеням. Методом теоретического конформационного анализа исследованы пространственные структуры молекул миомодулинов. Определены низкоэнергетические структуры молекул миомодулинов А,Е,В. На основе этих низкоэнергетических конформаций предложены метилированные аналоги миомодулинов А,Е,В. Известно, что N-метилованные аминокислоты, обладают интересной конформационной спецификой. Появление метильной группы при азоте радикально сказывается на конформационной свободе основной цепи как собственного, так и предшествующего остатка.

Нами была исследована структурно-функциональная организация молекул миомодулинов. Изучена пространственная структура молекулы Pro1-Met2-Ser3-Met4-Leu5-Arg6-Leu7-NH₂ миомодулина А и показана, что она может быть представлена одиннадцатью оптимальными конформациями. На основе этих оптимальных структур были изучены пространственные структуры [MeSer3]-, [MeMet4]-, и [MeArg6]- миомодулина А. Результаты расчета показали, что у аналогов [MeSer3]- и [MeMet4]- миомодулина А по две конформации являются низкоэнергетическими, а у аналога [MeArg6] – семь конформаций.

Расчет пространственной структуры молекулы Gly1-Leu2-Gln3-Met4-Leu5-Arg6-Leu7-NH₂ миомодулина Е показал, что в энергетический интервал 0-10,0 ккал/моль попадают конформации девяти форм основной цепи. На основе этих оптимальных конформаций изучена пространственная структура [MeLeu2]-, [MeGln3]-, [MeMet4]- и [MeMet7]- аналогов молекулы миомодулина Е. У аналога [MeLeu2]- миомодулина Е, все рассчитанные конформации попадают в энергетический интервал 0-10 ккал/моль, как и у природной молекулы. У аналога [MeGln3]- миомодулина Е семь конформаций попадают в энергетический интервал 0-8,0 ккал/моль. Результаты расчета показали, что у аналога [MeMet4]- пять конформаций, а у аналога [MeMet7]- всего две конформации являются низкоэнергетическими и они могут быть предложены для синтеза.

Исследование показало, что пространственная структура молекулы Gly1-Ser2-Tyr3-Arg4-Met5-Met6-Arg7-Leu8-NH₂ миомодулина В может быть представлена девятью конформациями, относительная энергия которых меньше 10.0 ккал/моль. На основе этих оптимальных конформаций изучены пространственные структуры [MeTyr3]-, [MeArg4]-, [MeArg7]-и [MeLeu8]- аналогов миомодулина В У аналога [MeTyr3]- три, у аналога [MeArg4]- четыре, у аналога [MeArg7]- две, у аналога [MeLeu8]- две конформации являются низкоэнергетическими. Поэтому, все эти аналоги могут быть предложены для синтеза.

«ГОЛОСА» ЯДРЫШКА ИНТЕРФАЗНОЙ КЛЕТКИ**Story of nucleoli in the interphase mammalian cell****Клемяшов И.В.**

Московский государственный университет информационных технологий, радиотехники и электроники, 119454, Москва, пр-т Вернадского, 78

Тел.: +7(499)434-67-92; e-mail: iv_klem@mail.ru

Кооперативные метаболические процессы в интерфазной клетке сопровождаются изменениями рефрактерности, которые были измерены в ядрышке методом Когерентной Фазовой Микроскопии (1). Характерные размеры области активности, пространственно-временные параметры и частоты флуктуаций согласуются с предположением об их связи с процессами транскрипции и синтеза пре-рибосом. В качестве объекта исследования использовались живые неокрашенные клетки культура НСТ-116 и тироциты человека.

Согласно современным представлениям (2-3) в каждом из кластеров с размером 60-100 нм и объемом около 0,01 мкм³ приблизительно на десятке транскрипционных единиц одновременно происходит синтез многих тысяч пре-рибосом. На каждой транскрипционной единице от 145 до 180 рРНК-полимераз (Pol I) иницируют и завершают синтез гигантских молекул-предшественников 45S. Скорость транскрипции 25-50 нуклеотидов в с. Средний интервал терминации, присоединения аминокислоты и АТФ 1-2 с. Из этого сценария следует, что на активном гене в течение каждого периода продолжительностью T @ 1-2 с происходят следующие процессы: самосборка и инициация Pol I, затем путем присоединения очередной аминокислоты происходит удлинение пре-рибосомы.

Исследование проведено на когерентном фазовом микроскопе «Эйрискан» с использованием компенсационного метода измерения фазы с пространственным разрешением до 50 нм и временным до 1 мс. Возможность значительного сверх разрешения и локализации флуктуаций были показаны при измерениях на тест-объектах (5).

Более мелкие детали структуры ядрышка и ее временные изменения стали заметны (4) при измерениях с большим увеличением (с объективом Olympus 50*/0,75) с полем изображения 4,5x4,5 мкм. Для локализации областей повышенной метаболической активности использовался метод динамической фазовой микроскопии ДФМ. Наиболее интенсивные флуктуации происходили вблизи границы ФЦ и ПФК с интенсивностью флуктуаций 35 нм². В окрестности максимума интенсивности происходили локальные процессы, которым в спектральном портрете соответствовали как протяженные низкочастотные (0,2-0,7 Гц) компоненты, так и короткие (до 50 нм) с частотами в интервале 0,7-1,5 Гц. Характер сигналов на трек-диаграммах и интенсивные спектральные компоненты в ограниченном интервале частот 0,3-2 Гц являются признаками их не случайной природы. Этот вывод был подтвержден ингибиторным анализом. Добавление 0,25 мкМ актиномина Д, который блокирует транскрипцию рДНК, показало снижение через 25 мин интенсивности флуктуаций до 6-8 нм² и исчезновение контрастных компонент в спектре.

Констатация ритмичности процессов транскрипции дает достаточно оснований для физического объяснения на качественном уровне происхождения «сигналов». Частоты флуктуаций на активном участке ядрышка оказались близки к величине 0,7 Гц, полученной из модельных представлений (2,3).

1. В.П. Тычинский, Возможен ли диалог с клеткой? *УФН*, 177, 2008.
2. M. Dundr et al, *Science* 298:1623-1626, 2002.
3. Grummt et al, *Gen&Dev* 17:1691-1702, 2003.
4. В.П. Тычинский, А.В. Кретушев, И.В. Клемяшов и др., *БЭБиМ*, 4, 473-477, 2007.
5. Tychinsky V.P et al *Biochim. Biophys. Acta.* 1708: 362-366, 2005.

ЗНАЧЕНИЕ ИЗОФОРМ БЕЛКОВ ТОНКОГО ФИЛАМЕНТА ДЛЯ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ПРЕДСЕРДИЙ

The significance of the isoforms of the thin filament proteins for calcium regulation of atrial contractility

Копылова Г.В., Набиев С.Р., Никитина Л.В., Щепкин Д.В.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Екатеринбург, Первомайская, 106

Тел.: +7(343)374-00-70; факс: +7(343)374-00-70; e-mail: g_rodionova@mail.ru

Сократительная функция миокарда предсердий и желудочков зависит от взаимодействия системы электро-механического сопряжения и сократительного аппарата кардиомиоцита. В сократительном аппарате миокарда млекопитающих экспрессируется ряд изоформ сократительных и регуляторных белков: две изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ): α и β [1]; две изоформы α -актина: сердечная (*caA*) и скелетная (*skA*) [2]; две изоформы цепей тропомиозина (ТМ): α и β [3]. Изменение условий функционирования предсердий при патологии приводит к смене изоформного состава белков кардиомиоцитов человека [4]. Целью исследования было выяснение вклада изоформ α -актина и цепей ТМ в сократительную функцию предсердий и ее кальциевую регуляцию.

$\alpha\beta$ ТМ (60% α - и 40% β -цепи) и *skA* получали из *m. psoas* кролика. Тропонин, *caA*, $\alpha\alpha$ ТМ и предсердный миозин экстрагировали из миокарда кролика. Миозин предсердий содержал α -ТЦМ и легкие цепи атриального типа. С помощью оптической ловушки определены кинетические и механические характеристики взаимодействия миозина предсердий с изоформами α -актина. В искусственной подвижной системы (ИПС) получена зависимость скорости движения реконструированных тонких филаментов, состоящих из актина, тропонина и ТМ, от концентрации кальция и оценены параметры уравнения Хилла.

Кинетические и механические характеристики взаимодействия миозина предсердий с актином не зависели от изоформ α -актина. Соотношение α/β -цепей ТМ не влияло на максимальную скорость движения тонких филаментов. С *skA* кальциевая чувствительность (pCa_{50}) зависимости pCa -скорость не зависела от соотношения α/β -цепей ТМ (6.83 и 6.80 для $\alpha\alpha$ ТМ и $\alpha\beta$ ТМ, соответственно). Для *caA* кальциевая чувствительность была выше с $\alpha\alpha$ ТМ, чем с $\alpha\beta$ ТМ (7.35 и 6.76, соответственно). Ранее для изоформ миозина желудочка мы показали, что β -цепь ТМ увеличивала pCa_{50} зависимости pCa -скорость для V3 миозина, как с *caA*, так и с *skA* [5], аналогично результатам, полученным на многоклеточных препаратах сердечной мышцы мышей [6]; но уменьшала pCa_{50} для V1 [5]. То есть, β -цепь ТМ уменьшает кальциевую чувствительность зависимости pCa -скорость для миозина с преобладанием α ТЦМ, но увеличивает для миозина с преимущественным содержанием β ТЦМ.

Таким образом, изоформы α -актина, цепей ТМ и тяжелых цепей миозина влияют на кальциевую регуляцию акто-миозинового взаимодействия в миокарде, что имеет значение для поддержания эффективной работы сердечной мышцы в онтогенезе и при патологических состояниях.

Работа поддержана грантами РФФИ (15-04-01558 и 13-04-40101-К) и программой РАН 0401-2014-0002.

1. Hoh, J.F., et al., J. Mol. Cell Cardiol., 1977, vol. 10, no. 11, pp. 1053-76.
2. Vandekerckhove, J., et al., J. Biol. Chem., 1986, vol. 261, no. 4, pp. 1838-43.
3. Perry, S.V., J. Muscle Res. Cell. Motil., 2001, vol. 22, no. 1, pp. 5-49.
4. Reiser, P.J., et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2001, vol. 280, no. 4, pp. 1814-20.
5. Kopylova, G.V., et al., J. Muscle Res. Cell Motil., 2015, vol. 36, p.108.
6. Muthuchamy, M., et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 1998, vol. 30, no. 8, pp. 545-57.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ Na,K-АТФАЗЫ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ**Molecular and functional diversity of Na,K-ATPase in skeletal muscle*****Кравцова В.В., Васильев А.Н., Кривой И.И.***

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Тел.: +7(812)328-97-41; e-mail: iikrivoi@gmail.com

Обзор литературных данных и результатов собственных исследований в области молекулярного разнообразия Na,K-АТФазы (НКА) и ее функциональных взаимодействий с молекулярным окружением. Этот важнейший транспортный белок поддерживает электрогенез, возбудимость и другие жизненно важные функции клетки. У млекопитающих известны четыре (α1-α4) изоформы каталитической альфа-субъединицы НКА, которые экспрессируются тканеспецифично и физиологически специализированы. В обзоре особое внимание уделено скелетной мышце, где экспрессируются α1- и α2-изоформы НКА. Новейшие данные свидетельствуют о функциональной и молекулярной связи НКА с различными рецепторами, ионными каналами, транспортерами и др. Специфические структурные домены позволяют НКА образовывать мультимолекулярные комплексы с мембранными и цитоскелетными белками, а также липидами и участвовать в качестве скафолда в формировании функциональных микродоменов (липидные плотники, кавеолы, сигналосомы). Благодаря этим особенностям НКА осуществляет сигнальную функцию и вовлечена в регуляцию разнообразных клеточных процессов, носящую изоформ-специфический характер. В частности, регуляция сократительной функции мышц кардиотоническими стероидами осуществляется за счет функционального взаимодействия α2-изоформы НКА с Na,Ca-обменником и рядом других белков в специализированных микрокомпартаментах мембраны. Установлено реципрокное функциональное и молекулярное сопряжение никотинового холинорецептора (нХР) и α2-изоформы НКА. Эти белки ко-локализованы в концевой пластинке, ко-иммунопреципитируют друг с другом, а также с фосфолемманом (белок FXYP1, регуляторная субъединица НКА) и кавеолином-3, что позволяет предположить их локализацию в кавеолах. Этот комплекс вовлечен в холинергическую модуляцию электрогенеза концевой пластинки, причем регуляторным сигналом для НКА может служить конформационный переход нХР в десенситизированное состояние под действием нанолярных концентраций его агонистов. Показано, что формирование никотиновой зависимости у крыс сопровождается нарушением функционирования именно α2-изоформы НКА. Установлен адаптационный характер изменений электрогенной активности, экспрессии мРНК и количества НКА в m. soleus крысы в период от 6 час до 3 суток функциональной разгрузки (антиортостатическое вывешивание). Эти изменения носят изоформ-специфический характер и затрагивают только α2-изоформу НКА. Таким образом, эти и многие другие данные свидетельствуют, что α2-изоформа НКА не только выполняет ряд специфических функций, но и сама более подвержена разнообразным регуляторным воздействиям по сравнению с основной насосной α1-изоформой. Предположительно, эти особенности α2-изоформы обусловлены ее функциональной и молекулярной связью с белковым окружением, локализацией в специализированных микродоменах клетки, а также менее стабильным встраиванием в плазматическую мембрану по сравнению с другими изоформами НКА.

Работа поддержана грантом РФФИ #13-04-00973а, а также НИР СПбГУ #1.50.1621.2013 и #1.38.231.2014.

ВЛИЯНИЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ И МЕХАНИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ В ОДНОМЕРНОЙ МОДЕЛИ ВОЛОКНА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Effects of the mechanical load on the electrical and mechanical activity of cardiomyocytes in a one-dimensional model of heart muscle fiber

Курсанов А.Г.1,2, Хамзин С.Ю.2, 1,2, Соловьева О.Э.1,2

1 – Институт иммунологии и физиологии (ИИФ) УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

2 – Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

Тел./факс: +7(343)362-34-41; e-mail: alexander.kursanov@gmail.com

В рамках одномерной математической модели сердечной мышцы [1] изучено влияние электрического и механического взаимодействия кардиомиоцитов на их функцию во время сокращений однородного волокна различной длины провиса под различными механическими нагрузками (постнагрузками).

Показано, что величина постнагрузки значительно влияет не только на характеристики укорочения волокна и его клеток, а также на их электрические свойства. Уменьшение нагрузки на волокно в модели приводит к увеличению длительности потенциала действия (ДПД) во всех клетках, что соответствует экспериментальным данным. Модель предсказывает, что характер распределения ДПД в волокне существенно зависит от величины механической нагрузки. Так, в изометрическом режиме сокращений волокна ДПД клеток монотонно уменьшается вдоль направления распространения волны возбуждения в волокне, а уменьшение нагрузки приводит к усложнению зависимости ДПД от положения клетки в ткани.

Проведен анализ влияния длины провиса волокна (т.е. протяженности, а не растяжения волокна) на его электромеханическую функцию. Ранее нами было показано, что в изометрическом режиме сокращения в более длинном волокне устанавливается больший градиент электро-физиологических свойств клеток. В отличие от этого, в постнагрузочном режиме сокращения увеличение длины волокна уменьшает неоднородность системы, что проявляется в снижении градиентов функциональных характеристик электромеханического сопряжения во взаимодействующих клетках, в частности градиентов ДПД, длительности и амплитуды Ca^{2+} перехода, диастолической концентрации Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме. Удивительным оказался факт, что электромеханические свойства клеток, расположенных на одном и том же расстоянии от источника возбуждения, зависят не только от режима сокращения, но и от общей протяженности волокна.

Проанализированы внутриклеточные механизмы, лежащие в основе эффектов механического взаимодействия последовательно соединенных элементов неоднородной миокардиальной системы в постнагрузочном режиме сокращения. Показано, что ключевую роль в установлении неоднородности в исходно однородном волокне играют механизмы механо-электрической обратной связи. Выявлена координирующая роль изометрической фазы цикла сокращения сердечной мышцы (тем продолжительнее, чем выше постнагрузка), которая предопределяет дальнейшее изотоническое укорочение-растяжение и расслабление волокна.

Работа поддержана грантами РФФИ № 14-01-00885, 14-01-31134 и РНФ №14-35-00005.

1. Katsnelson, L.B., Vikulova, N.A., Kursanov, A.G., Solovyova, O.E., and Markhasin, V.S., Electro-mechanical coupling in a one-dimensional model of heart muscle fiber, Russ. J. Numer., 2014, vol. 29, no. 5, pp. 275-84.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ТРОПОМИОЗИНА НА ИЗГИБНУЮ ЖЁСТКОСТЬ ТОНКОЙ НИТИ, ИЗМЕРЕННОЕ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ**Effect of tropomyosin mutations on the flexibility of thin filament measured with optical trap****Набиев С.Р.1, Овсянников Д.А.1, Цатурян А.К.2, Бершицкий С.Ю.1**

1 – Институт иммунологии и физиологии, УрО РАН, Екатеринбург, 620049, Россия, Первомайская, 106

2 – Институт механики, МГУ, Москва, 119192, Россия, Мичуринский проспект, 1

Тел.: +7(343)374-13-16; факс: +7(343)374-13-16; e-mail: s.bershitsky@iip.uran.ru

Тропомиозин (ТМ) – регуляторный белок, входящий в состав тонких нитей мышечных клеток. Молекула ТМ представляет собой спирализованный димер α -спиралей, который обвивает актиновую нить и контролирует её взаимодействие с миозином. В структуре ТМ присутствуют консервативные неканонические остатки, дестабилизирующие двойную спираль. Замены двух из них, G126 и D137, в центральной части молекулы на канонические ведут к изменению как функциональных свойств молекулы, так и ее механических характеристик. С помощью двухлучевой оптической ловушки мы показали, что эти мутации влияют на изгибную жёсткость тонкой нити. Это наблюдение подтверждает гипотезу о влиянии механических характеристик ТМ на его регуляторную функцию [1,2], а именно, на распространение механической волны активации вдоль тонкой нити.

Для измерения изгибной жёсткости реконструированной тонкой нити, состоящей из флуоресцентно-меченого актина, ТМ и тропонинового комплекса, использовалась двухлучевая оптическая ловушка [3-5], построенная на базе инвертированного флуоресцентного микроскопа. Лучами удерживали два полистироловых шарика диаметром 0.9 мкм, к которым клеили фрагмент тонкой нити длиной 6-9 мкм. Положение шариков регистрировали квадрантными фотодиодами, положением одного из лучей управляли с помощью акусто-оптического модулятора.

Сборку из шариков и тонкой нити растягивали с помощью подвижной ловушки серией шагов по 50 нм и записывали сигнал осевого положения шариков в течение 1 с после каждого шага. Растягивающую силу определяли как произведение отклонения шарика в неподвижной ловушке на её жёсткость. Жёсткость оценивали по спектру броуновского шума шариков в лучах перед каждым циклом растяжения. Расстояние между шариками измеряли по микрофотографиям, снятым ССD камерой. В отсутствие растягивающей силы нить выпрямлена. Растяжение ведёт к изгибу нити и одновременному повороту шариков, так что точки крепления нити на шариках смещаются друг к другу.

Результаты работы [6] указывают на то, что нативный ТМ, и особенно стабилизирующие мутации в центральной части молекулы ТМ вызывают измеримое увеличение жёсткости реконструированной тонкой нити.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 13-04-40100-Н и 13-04-40101-Н.

1. Loong, C.K., Badr, M.A., et al., *Front. Physiol.*, 2012, vol. 3, p. 80, doi: 10.3389/fphys.2012.00080.
2. Matyushenko, A.M., Artemova, N.V., Shchepkin, D.V., et al., *FEBS J.*, 2014, vol.281, pp. 2004–2016.
3. Finer, J.T., Simmons, R.M., and Spudich, J.A., *Nature*, 1994, vol. 368, pp. 113-119.
4. Takagi, Y., Homsher, E.E., Goldman, Y.E., and Shuman, H., *Biophys. J.*, 2006, vol. 90, pp. 1295-1307.
5. Набиев, С.Р., Овсянников, Д.А., и Бершицкий, С.Ю., *Биофизика*, 2008, т. 53, сс. 929-935.
6. Nabiev, S.R., Ovsyannikov, D.A., Tsaturyan, A.K., and Bershitsky, S.Y., *Biophys. J.*, 2015, vol. 109, pp. 373-379.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА ПОД НАГРУЗКОЙ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

Study of lifetime of actomyosin complex under load with the optical trap technique

Набиев С.Р.1, Овсянников Д.А.1, Цатурян А.К.2, Бершицкий С.Ю.1

1 – Институт иммунологии и физиологии, УрО РАН, Екатеринбург, 620049, Россия, Первомайская, 106

2 – Институт механики, МГУ, Москва, 119192, Россия, Мичуринский проспект, 1
Тел.: +7(343)374-13-16; факс: +7(343)374-13-16; e-mail: s.nabiev@iip.uran.ru

При эксцентрическом сокращении мышца удлиняется, при этом к актомиозиновым поперечным мостикам приложена нагрузка, превышающая силу, которую они генерируют. С помощью двухлучевой оптической ловушки [1] мы смоделировали условия эксцентрического сокращения на уровне одиночного актомиозинового комплекса и исследовали зависимость времени жизни комплекса миозина из быстрой скелетной мышцы кролика и филаментарного актина от нагрузки и концентрации АТФ. Для задания постоянной нагрузки мы использовали изометрический режим нагружения, предложенный Takagi и др. [2] с небольшой модификацией. Генерация силы одиночной миозиновой молекулой, присоединенной к актиновой нити гантелеобразного зонда [1], автоматически запускала протокол нагружения. Нагрузка росла до некоторого предустановленного уровня и затем оставалась постоянной до момента отсоединения молекулы миозина от актиновой нити. Диапазон нагрузок включал таковые, превышающие изометрический уровень, воспроизводя таким образом условия эксцентрического сокращения на уровне одиночной молекулы. Концентрация АТФ была ограничена диапазоном от 3 до 6 мкМ.

Время жизни актомиозина измерялось от момента достижения заданного уровня нагрузки до распада комплекса. Частотное распределение времени жизни было двухфазным, сначала оно быстро росло, а затем сравнительно медленно падало [3]. Распределение аппроксимировали суммой двух экспонент. Константы скорости обеих компонент росли с нагрузкой, при этом быстрая компонента была более чувствительна к нагрузке, чем медленная. Медленная компонента ускорялась пропорционально концентрации АТФ, тогда как быстрая от неё не зависела.

Veigel и др. [4] в подобных экспериментах на оптической ловушке обнаружили, что константы скорости распределения времени жизни для гладкомышечного миозина хорошо согласуются со скоростями двух фаз его рабочего шага. Принимая во внимание этот факт, мы можем предположить, что распределения, полученные в наших экспериментах, указывают на подобный двухшаговый механизм рабочего шага в быстром скелетном миозине.

Работа поддержана Грантами РФФИ 13-04-40100-Н и 13-04-40101-Н, а также программой УрО РАН, проект № 12-Р-4-1007.

1. Finer, J.T., Simmons, R.M., and Spudich, J.A., Nature, 1994, vol. 368, pp. 113-119.
2. Takagi, Y., Homsher, E.E., Goldman, Y.E., and Shuman, H., Biophys. J., 2006, vol. 90, no. 4, pp. 1295-1307.
3. Nabiev, S.R., Ovsyannikov, D.A., Tsururyan, A.K., and Bershitsky, S.Y., Eur. Biophys. J., 2015, vol. 44, no. 6, pp. 457-463.
4. Veigel, C., Molloy, J.E., Schmitz, S., and Kendrick-Jones, J., Nat Cell Biol, 2003, vol. 5, no. 11, pp. 980-986.

ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННАЯ МОДЕЛЬ RYR-КАНАЛОВ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ДИНАМИКИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В СЕРДЕЧНЫХ КЛЕТКАХ**Electron-Conformational Model of the RyR-channels and Modeling the Stochastic Dynamics of Calcium in the Cardiac Cells*****Рывкин А.М.1,2, Москвин А.С.1, Соловьёва О.Э.1,2,3***

1 – Уральский федеральный университет, 620083, Екатеринбург, ул. Мира, 19

2 – Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620219, Екатеринбург, ул. Первомайская, 91

3 – Институт математики и механики, 620049, Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 106

Тел. (3432)3623400, e-mail: alex-ryvkin@yandex.ru

Центральным звеном электромеханического сопряжения *возбуждение- сокращение* в клетках рабочего миокарда и формирования сердечного ритма в клетках ритмоводителя является *кальцием вызванное высвобождение кальция* через рианодиновые рецепторы (RyR-каналы) саркоплазматического ретикулума – гигантские белки, состоящие из четырёх субъединиц с молекулярной массой около 565 кДа.

Как альтернатива традиционным Марковским моделям RyR-канала ранее нами была предложена [1] и развита [2-4] простая биофизически обоснованная электронно-конформационная (ЭК) модель, в которой огромное количество степеней свободы канала сводится всего к двум – быстро изменяющейся условно называемой «*электронной*» и медленной *конформационной*. Состояния канала описываются двухъямным конформационным потенциалом, минимумы которого соответствуют открытому и закрытому состояниям RyR-канала. Модель описывает как одиночные каналы, так и RyR кластеры. Моделирование динамики RyR в рамках ЭК модели [1-4] позволили воспроизвести практически все известные на сегодня эффекты – стохастический характер динамики при стационарных условиях, изменение вероятности процессов открытия закрытия каналов при различном уровне концентрации Ca^{2+} как со стороны диадного пространства (cis[Ca]) и со стороны люмена СР (trans[Ca]), процессы адаптации канала и др. Нами развита математическая модель стохастической динамики изолированной Ca^{2+} -высвобождающей единицы в клетках водителя сердечного ритма, прежде всего режима авторитмической активности (Ca^{2+} -«часы»), определяющего пейсмекерную функцию клеток ритмоводителя. Конформационное взаимодействие между RyR-каналами оказывается важным фактором стабильности работы Ca^{2+} -«часов» [3]. Развита единая модель кальциевой динамики в клетках водителя сердечного ритма с учетом взаимодействия внешнего мембранного и внутриклеточного Ca^{2+} осцилляторов («мембранных и Ca^{2+} -часов»). Показано, что взаимодействие двух осцилляторов обеспечивает устойчивый режим генерации потенциала действия в клетках ритмоводителя даже в условиях стохастической Ca^{2+} динамики.

В целом ЭК модель представляет новый подход к исследованию RyR-каналов как одного из важнейших структурных и функциональных элементов сердечной клетки и прогнозированию позитивных и негативных эффектов их влияния на работу сердца.

Исследования поддержаны Программой повышения конкурентоспособности ведущих университетов РФ (постановление Правительства РФ № 211 от 16 марта 2013 г.) и грантом РФФИ №14-35-00005.

1. Moskvina, A.S., et al., Prog. Biophys. Mol. Biol., 2006, vol. 90, no. 1, p. 88.
2. Moskvina, A.S., и др., Письма в ЖЭТФ, 2015, №102, с. 1.
3. Рывкин, А.М., и др., ДАН, 2012, т. 444, №5, с. 572.
4. Moskvina, A.S., и др., Письма в ЖЭТФ, 2011, т. 93, №7, с. 403.

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ КИНАЗА ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ УПРУГОСТИ КОРТИКАЛЬНОЙ ЦИТОПЛАЗМЫ ЭНДОТЕЛИЯ МИКРОСОСУДОВ ЛЕГКИХ МЫШИ

High molecular weight myosin light chain kinase participates in regulation of cortical cytoplasm stiffness in mouse lung microvascular endothelium

Самсонов М.В.1, Халисов М.М.2, Пенниайнен В.А.2, Анкудинов А.В.3, Ширинский В.П.1

1 – Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, 121552, Москва,

2 – Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

3 – Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

Тел.: +7(495)414-67-03; e-mail: shirinsky@cardio.ru

Эндотелиальные клетки обладают механочувствительностью и способны воспринимать напряжение сдвига, создаваемое потоком крови на их поверхности, а также растяжение субстрата, к которому они прикреплены. Показано, что механические воздействия определяют ориентацию эндотелиальных клеток вдоль сосуда и активируют эндотелиальную NO-синтазу. Таким образом, механические сигналы имеют существенное значение для биологии эндотелия. Механизмы механорецепции эндотелиальных клеток исследованы недостаточно. Предполагается роль цитоскелета в восприятии и передаче механических воздействий в частности за счет модуляции его собственной жесткости. Механические свойства цитоскелета определяются перешивкой его фибриллярных компонентов (актиновых филаментов, промежуточных филаментов и микротрубочек) между собой, а также работой миозиновых моторов и формированием пучков актомиозина. Мы исследовали вклад 210 кДа высокомолекулярной киназы легких цепей миозина (КЛЦМ210), ключевого активатора моторной активности миозина II, в регуляцию упругости цитоплазмы культивируемых эндотелиальных клеток (ЭК). ЭК выделяли методом иммуномагнитной сепарации из ткани легких мышей дикого типа и животных с генетическим нокаутом КЛЦМ210 (любезно предоставлены проф. Д.М. Ваттерсоном, Северо-Западный Университет, Чикаго, США). Живые ЭК исследовали в топографическом и тактильном режимах с помощью атомного силового микроскопа Bruker Bioscope Catalyst (Германия), интегрированного в инвертированный оптический микроскоп Carl Zeiss Axio Observer D1m (Германия), используя специально сконструированный кантилевер с субмикронным сферическим зондом на конце иглы, минимизирующий повреждение цитоплазматической мембраны (Няпшаев и соавт., 2012). Дополнительно, КЛЦМ210 ингибировали 10 мкМ ML7. Было установлено, что упругость (модуль Юнга, кПа) ЭК над ядром в 3.5-7 раз ниже упругости их кортикальной цитоплазмы. Упругость кортикальной цитоплазмы ЭК дикого типа составляла 165 ± 29 (n=9) и падала до 99 ± 50 при обработке клеток ML7. Упругость кортикальной цитоплазмы ЭК без КЛЦМ210 составляла 102 ± 37 (n=9) и не изменялась при добавлении ML7. При топографической съемке в области кортикальной цитоплазмы ЭК четко выявлялись фибриллярные структуры, формирующие пучки и сети. Упругость ядерной области достоверно не отличалась в ЭК дикого типа и ЭК без КЛЦМ210 и не изменялась при ингибировании каталитической активности КЛЦМ. Полученные данные указывают на участие КЛЦМ210 в регуляции упругости кортикальной, но не окооядерной цитоплазмы ЭК микрососудов легких мыши. Для повышения упругости цитоплазмы важна каталитическая активность КЛЦМ210, обуславливающая активацию актомиозинового сокращения и локальное уплотнение актомиозинового цитоскелета. Таким образом, КЛЦМ210 может играть важную роль в механобиологии эндотелия.

Поддержано грантом РФФИ 14-04-01813.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОСТОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ МИОКАРДА ДЛЯ ОПИСАНИЯ СОКРАЩЕНИЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА**The use of a simple kinetic model of cardiac muscle for simulation of the left ventricle of the heart***Сёмин Ф.А., Цатурян А.К.*НИИ механики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Мичуринский пр. д. 1
тел.: +7(495)939-12-52; e-mail: san@aviel.ru

Поскольку биофизические процессы, лежащие в основе сокращений и электро-механического сопряжения в сердечной мышце связаны сложными прямыми и обратными связями, важнейшую роль в понимании механизмов работы сердца в норме и при патологии играют математические модели. Современный уровень исследований миокарда человека с помощью ультразвуковых, рентгеновских и магниторезонансных методов позволяет получить весьма детальную картину движения стенок камер сердца конкретного пациента, а уровень развития вычислительной техники и численных методов позволяют моделировать сокращения сердца с учётом этих деталей. Узким местом при этом оказывается сама модель миокардиальной ткани, которая должна адекватно описывать кинетику актин-миозинового взаимодействия, регуляцию этого взаимодействия ионами кальция и обратное воздействие механических параметров на систему кальциевой регуляции конкретного пациента с учетом неоднородностей этих параметров, характерных для некоторых патологий.

Нами предложена простая модель сокращения миокарда и его активации, ранняя версия которой опубликована в работах [1, 2]. Определяющие соотношения этой модели представляют собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений. Модель адекватно описывает широкий круг экспериментальных данных о механических свойствах расслабленного и сокращающегося миокарда и характеристиках системы кальциевой регуляции, включая зависимость параметров сокращения от длины саркомеров, лежащую в основе закона Франка-Старлинга, и грузозависимое расслабление миокарда.

Эту модель применили для описания работы левого желудочка сердца с упрощенной геометрией: желудочек аппроксимировали толстостенным цилиндром с заданным ходом волокон, ориентация которых радикально меняется при продвижении от внутренней поверхности желудочка к наружной [3]. Модель адекватно описывает основные параметры осевой и окружной деформации желудочка, его скручивание, конечно-диастолический, конечно-систолический и ударный объемы, давления в желудочке и магистральных артериях. Модель объясняет функциональное значение сложного распределения ориентации мышечных волокон в стенке желудочка, которая в сочетании со скручиванием желудочка в ходе его сокращения обеспечивает однородное сокращение саркомеров по всей толщине стенки. Кроме того, модель адекватно воспроизводит основные особенности изменения значений перечисленных выше величин при некоторых кардиомиопатиях [3], а также их реакцию на изменения пред- и постнагрузки и динамических характеристик артериального русла.

Также мы разработали конечно-элементную осесимметричную модель желудочка с треугольными элементами и линейной аппроксимацией узловых значений, которая была протестирована путем сравнения с результатами расчета в рамках описанной выше модели одномерного цилиндрического желудочка и показала их хорошее соответствие.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-35-00005.

1. Сёмин, Ф.А. и Цатурян, А.К., Биофизика, 2012, т. 57, №5, сс. 840-847.
2. Сёмин, Ф.А., Биофизика, 2014, т. 59, №5, сс. 951-958.
3. Сёмин, Ф.А. и Цатурян, А.К., Доклады Академии наук, 2015, т. 462, №2, сс. 233-237.

КАЛЬПОНИНОПОДОБНЫЙ БЕЛОК МИДИИ ГРЕЯ КОНКУРЕНТНО ИНГИБИРУЕТ АКТОМИОЗИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Calponin-like protein of the mussel is a competitive inhibitor for actomyosin interaction

Сиренко В.В.1, Добржанская А.В. 2, Шелудько Н.С. 2, Боровиков Ю.С. 1

1 – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;

2 – Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 690041, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

e-mail: inc_secretary@mail.ru

Кальпониноподобный белок, недавно выделенный из актиновых волокон запирающей мышцы мидии Грея, ингибирует актин-миозиновую АТФазу [1], что может свидетельствовать об его участии в регуляции АТФазного цикла. Кальпониноподобный белок имеет ряд общих свойств и структурную гомологию с кальпонином гладких мышц позвоночных. Известно, что гладкомышечный кальпонин в 6 раз уменьшает значение V_{max} и незначительно увеличивает K_{ATPase} актомиозинового взаимодействия [2], то есть, ингибирует неконкурентно, «выключая» мономеры актина. Мы исследовали влияние кальпониноподобного белка на кинетические параметры АТФазной активности актомиозина. Применение к актомиозиновому взаимодействию кинетического подхода, используемого в энзимологии, оправдано тем, что актин может рассматриваться как фермент, ускоряющий выход неорганического фосфата из нуклеотид-связывающего сайта головки миозина, а сама головка миозина, – субстратом [3]. В этой динамичной структуре роль ингибиторов могут выполнять актин-связывающие белки, такие как кальпонин, кальпониноподобный белок или тропомиозин. Взаимодействуя с актомиозином из скелетных мышц в экспериментах *in vitro*, кальпониноподобный белок ингибировал актомиозиновую АТФазу, существенно не влияя на величину V_{max} , но в 2,5 раза увеличивая K_{ATPase} , то есть, стерически блокируя взаимодействие актина с миозином. Такая динамика актомиозинового взаимодействия соответствует конкурентному типу ингибирования кальпониноподобным белком АТФазного цикла. Таким образом, результаты нашего исследования показали, что механизмы ингибирования актомиозиновой АТФазы гладкомышечным кальпонином и кальпониноподобным белком, – различны. Предполагается, что отсутствие ингибирующей АТФазу гексапептида VKYAEK в последовательности кальпониноподобного белка и его присутствие в гладкомышечном кальпонионе и определяет существенное различие в механизмах ингибирования актомиозиновой АТФазы этими двумя белками. Тропомиозин в наших экспериментах ингибировал АТФазу актомиозина, в 1,5 раза уменьшая значение V_{max} , и не влияя на K_{ATPase} , то есть неконкурентно. Из этого следует, что тропомиозин не должен влиять на ингибирующие свойства кальпониноподобного белка.

1. Dobrzhanskaya, A.V., et al., J. Muscle Res. Cell Motil., 2013, vol. 34, pp. 23-33.

2. Horiuchi, K.Y. and Chacko, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, vol. 176, pp. 1487-1493.

3. Lehrer, S.S. and Geeves, M.A., J. Mol. Biol., 1998, vol. 277, pp. 1081-1089.

МИКРОТРУБОЧКИ НЕ ИСЧЕЗАЮТ ИЗ ЦИТОПЛАЗМЫ ДЕЛЯЩИХСЯ МЕЛАНОФОРОВ ЛИЧИНОК XENOPUS LAEVIS**Microtubules do not disappear from cytoplasm of dividing melanophores of *Xenopus laevis* larvae****Стародубов С.М.1, Никерясова Е.Н.1, Голиченков В.А.1**

1– Биологический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-14-62; факс: +7(495)939-43-09; e-mail: smstarodubov@gmail.ru

Дермальные меланофоры личинок бесхвостых амфибий – это удобный объект для изучения одной из форм внутриклеточной подвижности. Как и дермальные меланофоры взрослых рыб, амфибий и рептилий они способны к внутриклеточному перемещению пигментных гранул (меланосом), обеспечивая быстрое приспособительное изменение окраски животных (1). Перемещение меланосом, как и передвижение хромосом во время митоза, происходит благодаря наличию микротрубочек и двух моторных белков – динеина и кинезина. Известно также, что дермальные меланофоры личинок бесхвостых амфибий способны к делению (2). (Следует отметить, что мы не встречали данных о том, могут ли делиться меланофоры взрослых животных.) Естественно, было интересно сравнить поведение меланосом в интерфазных и делящихся меланофорах. Используя длительную прижизненную фоторегистрацию с 5 минутным интервалом, мы изучили картину перемещения меланосом в интерфазе и во время митоза в дермальных меланофорах *Rana esculenta*, в которых область ядра хорошо различима все время (2). В пяти из 1028 исследованных меланофоров нам удалось проследить за передвижением пигментных гранул как во время агрегации и дисперсии пигмента, так и в течение митоза. В наиболее информативном случае уже примерно за 20 мин до исчезновения границы ядра (60 мин до окончания цитотомии) в одной из клеток было замечено изменение ориентации ядра (указание на профазу). Скорее всего, оно было результатом активности астральных микротрубочек, которые в профазе в это же время перемещают центриоли к будущим полюсам митотического веретена. Примерно за 10 мин до исчезновения границы ядра у всех поделившихся меланофоров было отмечено начало перемещения меланосом, нечувствительное (может быть малочувствительное) к внешним факторам. Подобное независимое перемещение пигмента продолжалось примерно до анафазы (такие фазы митоза как метафаза и анафаза удавалось определять по форме светлого участка, остававшегося после исчезновения границы ядра). Естественно возник вопрос, за счет чего происходит передвижение меланосом во время митоза, если было общепринято, что в это время все микротрубочки сосредоточены в митотическом веретене. Для его выяснения мы провели изучение ультраструктуры дермальных меланофоров личинок *Xenopus laevis* на стадии метафазы (3), используя стандартную методику. Оказалось, что микротрубочки сохраняются в цитоплазме этих клеток во время деления. Может быть, они просто стабилизированы наличием меланосом или все-таки участвуют в их перемещении. Наличие микротрубочек в цитоплазме делящихся клеток также свидетельствует против старой гипотезы о том, что пула тубулина в клетках хватает лишь для формирования веретена.

1. Bagnara, J.T. and Matsumoto, J., The pigmentary system: physiology and pathophysiology, Blackwell Publishing Ltd., 2006, pp.11-59.
2. Стародубов, С.М. и Голиченков, В.А., Онтогенез, 1988, т. 19, №3, сс. 279-283.
3. Семерджиева, С.И., Никерясова, Е.Н., и др., Докл. АН, 1992, т. 324, №3, сс. 685-686.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ МЕХАНИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА КЛЕТКИ НЕОДНОРОДНОГО МИОКАРДА

Specific effects of the mechanical load on isolated cells from heterogeneous myocardium

Хохлова А.Д.^{1,2}, Ирибэ Г.А., Соловьева О.Э. ^{1,2,3}

1 – Уральский федеральный университет, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

2 – Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620002, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

3 – Институт математики и механики УрО РАН, 620990, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 16

4 – Университет Окаяма, высшая школа медицины, стоматологии и фармацевтических наук, 1700-8558, Япония, Окаяма, Шиката-чо, 2-5-1

Тел.: +7(343)362-34-00; факс: +7(343)362-34-41; e-mail: a.khokhlova@iip.uran.ru

Показано, что электрические и механические свойства клеток миокарда трансмурально неоднородны в стенке левого желудочка. В данной работе мы исследовали механический ответ кардиомиоцитов из различных трансмуральных слоев левого желудочка мыши на изменение механической нагрузки на клетку и воспроизвели результаты экспериментов в рамках наших математических моделей электромеханической функции кардиомиоцитов.

Различия в ответе изолированных субэндокардиальных (ЭНДО) и субэпикардиальных (ЭПИ) клеток на механическую нагрузку были исследованы при помощи метода измерения биомеханических характеристик описанного в работе [1]. В этом методе каждый конец клеток зажимается парой карбоновых волокон, что позволяет варьировать пред- и постнагрузку, приложенную к клеткам. Мы использовали наши интегративные модели ЭНДО и ЭПИ клеток, разработанные нами ранее [2, 3], для того, чтобы воспроизвести и проанализировать различия в ответе кардиомиоцитов на изменение механической нагрузки и выявить основные внутриклеточные механизмы, ответственные за эти различия.

Мы показали, что время достижения максимума (ВДМ) сокращения значительно больше в ЭНДО клетках по сравнению с ЭПИ клетками, а характерное время расслабления (ВР) не отличается в ЭНДО и ЭПИ клетках при разных значениях постнагрузки. При этом мы не нашли статистически значимых различий в механическом ответе ЭНДО и ЭПИ клеток на изменение постнагрузки. И в ЭНДО, и в ЭПИ клетках ВДМ значительно больше, а ВР значительно меньше при малых значениях постнагрузки по сравнению с большими постнагрузками. Также мы показали, что при малых преднагрузках ВДМ значительно больше в ЭНДО клетках по сравнению с ЭПИ клетками. Увеличение преднагрузки (растяжение диастолической длины саркомеров на 3-5% от контрольного значения) привело к увеличению ВДМ и в ЭНДО, и в ЭПИ клетке, однако, более выраженное замедление ВДМ было зарегистрировано в ЭПИ клетках, что привело к уменьшению трансмурального градиента ВДМ. Мы не нашли существенно значимых различий в изменении ВР в ЭНДО и ЭПИ клетках при увеличении преднагрузки. Наши ЭНДО и ЭПИ математические модели воспроизводят экспериментальные результаты и показывают, что различия в параметрах кооперативной кальциевой активации миофиламентов между клетками могут обеспечить наблюдаемое в экспериментах уменьшение неоднородности механических свойств клеток, предсказывая более однородное механическое поведение миокардиальной ткани по сравнению с изолированными клетками.

Поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (14-01-00885, 14-01-31134, 13-04-00365).

1. Iribe, G., Kaneko, T., Yamaguchi, Y., and Naruse, K., Prog. Biophys. Mol. Biol., 2014, vol. 115, pp. 103-114.
2. Vasilyeva, A. and Solovyova, O., Computing in Cardiology, 2012, vol. 39, pp. 453-456.
3. Васильева, А.Д. и Соловьева, О.Э., Биофизика, 2012, т. 50, №5, сс. 852-859.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ И ПРОВОДИМОСТЬ РИАНОДИНОВОГО РЕЦЕПТОРА СЕРДЕЧНОЙ КЛЕТКИ**Temperature dependence of cardiac ryanodine receptor gating and conductance****Япаров Б.Я.1, Москвин А.С.1, Рывкин А.М.1,2, Соловьёва О.Э.1,2**

1 – Уральский Федеральный Университет, 620083, Екатеринбург, ул. Ленина, 51;

2 – Институт Иммунологии и Физиологии УрО РАН, 620219, Екатеринбург, ул. Первомайская, 91

e-mail: ybogdan@yandex.ru

Температура является одним из важнейших внешних факторов, влияющих на все физиологические процессы, в частности, на внутриклеточную динамику кальция в рабочих кардиомиоцитах и клетках синусно-предсердного узла. Центральным звеном электромеханического сопряжения и формирования сердечного ритма является высвобождение кальция через рианодиновые рецепторы (RyR) саркоплазматического ретикулума – гигантские белки, состоящие из четырёх субъединиц с молекулярной массой около 565 кДа. Нарушения молекулярной структуры RyR, включая генетические, приводят к нарушению стохастической динамики RyR и, в целом, внутриклеточной кальциевой динамики, что может являться одной из главных причин острых сердечных недостаточностей и аритмий.

Несмотря на ряд феноменологических моделей [1,2], молекулярные механизмы, лежащие в основе температурных физиологических эффектов практически не исследованы.

В данной работе мы показываем, что простая биофизически обоснованная электронно-конформационная (ЭК) модель, предложенная ранее для описания активности и проводимости RyR [3], позволяет объяснить все основные эффекты влияния температуры на функционирование RyR каналов. Модель предполагает наличие всего лишь двух степеней свободы – быстрой (электронной) и медленной (конформационной), определяющих энергетическое состояние канала, и учитывает электронные и туннельные переходы между различными электронными состояниями канала и конформационную динамику, описываемую эффективным уравнением Ланжевена, в котором предполагается, что вязкое конформационное трение и температурные флуктуации, вообще говоря, не подчиняются флуктуационно-диссипативной теореме. Моделирование динамики RyR в рамках ЭК модели методом Монте-Карло [4] и параметрический анализ позволили воспроизвести основные температурные эффекты, наблюдаемые в экспериментах [5] по исследованию влияния температуры на активность и проводимость одиночного RyR в липидном бислое, которые показывают, что с уменьшением температуры:

- Увеличивается вероятность пребывания RyR в открытом состоянии
- Увеличивается среднее время пребывания RyR в открытом состоянии
- Среднее время пребывания RyR в закрытом состоянии меняется незначительно
- Максимальная проводимость канала падает линейно.

Исследования поддержаны Программой повышения конкурентоспособности ведущих университетов РФ (постановление Правительства РФ № 211 от 16 марта 2013 г.) и грантом РНФ №14-35-00005.

1. Clapham, D.E., and Miller, C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, vol. 108, pp. 19492-19497.
2. Jara-Oseguera, A. and Islas, L. D., Biophys J., 2013, vol. 104, no. 10, pp. 2160-2169.
3. Moskvin, A.S., et al., Doklady Biochemistry and Biophysics, 2005, vol. 400, pp. 32-37.
4. Moskvin, A.S., Iaparov, B. I., Ryvkin, A. M., et al., Pis'ma v ZhETF, 2015, vol. 102, pp. 67-73.
5. Sitsapesan, R., Montgomery, R. A. P., and Williams, A. J., J. Physiol., 1991, vol. 434, pp. 469-488.

**Механизмы трансформации энергии:
Митохондрии, Фотосинтез**

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У БУЛЬБЭКТОМИРОВАННЫХ МЫШЕЙ – МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Impairments in mitochondrial respiratory chain complexes and oxidative stress in the brain of bulbectomized mice – model of sporadic Alzheimer's disease

Аветисян А.В.1, Симонян Р.А.1, Самохин А.Н.2, Бывшев И.М.3, Бобкова Н.В.2

1 – НИИФХБ им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы 1, стр. 40

2 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская 3;

3 – Московский физико-технический институт, 141700, г. Долгопрудный, Московская область, Институтский переулок 9

e-mail: avetis@genebee.msu.ru

Билатеральное удаление обонятельных луковиц у грызунов вызывает комплекс симптомов, сходный с признаками развития нейродегенеративного альцгеймеровского процесса. Ольфакторно бульбэктомированные (ОБЭ) половозрелые самцы линии мышей NMRI демонстрируют потерю пространственной памяти, выраженный апоптоз нейронов в коре и гиппокампе, дефицит ацетилхолинергической и серотонинергической систем мозга, а также повышенный уровень мозгового амилоида- β ($A\beta$) и фосфорилированного Тау [1]. Известно, что функциональное нарушение и $A\beta$ -индуцированный окислительный стресс в митохондриях мозговых клеток играют важную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Митохондрии выступают одновременно в качестве инициатора, участника и мишени нейродегенеративного процесса. На ранних стадиях развития болезни, 5 недель после бульбэктомии, в клетках коры и гиппокампа ОБЭ мышей нами были обнаружены функциональные нарушения энергетического метаболизма. Также значительное накопление эндогенного $A\beta$ регистрировали как в гомогенатах коры и гиппокампа, так и в выделенных из клеток этих структур митохондриях. Изолированные из мозговых тканей ОБЭ мышей митохондрии демонстрировали низкие скорости дыхания в состоянии 3 и 4, по сравнению с контрольными митохондриями из ложноперирированных мышей. Вследствие низкой активности дыхательной цепи были одновременно снижены мембранный потенциал и дыхательный контроль ОБЭ митохондрий. Изучение активности комплексов дыхательной цепи выявило значительное снижение скорости комплексов I (NADH:убихинон оксидоредуктаза) и IV (цитохром c оксидаза). Наблюдаемые нами нарушения электрон-транспортной цепи ОБЭ мышей более ярко были выражены в митохондриях из гиппокампа, по сравнению с корой. Дифференциальные спектры поглощения гема *a* в составе цитохромоксидазы позволили нам оценить количество комплекса IV в митохондриях ОБЭ животных. Было установлено, что содержание гема *a* и, следовательно, комплекса IV в гиппокампе ОБЭ мышей на 30% снижено, по сравнению с контрольными митохондриями. Нарушения передачи электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий приводили к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК) и к окислительному стрессу нейронов. Измерения скорости генерации перекиси водорода при окислении сукцината показали высокие значения, подавляемый ротеноном, в митохондриях из ОБЭ мышей. Также были зарегистрированы повышение уровня малонового диальдегида – показателя перекисного окисления липидов, в тех же митохондриях. Высокий уровень АФК мог быть следствием нарушения транспорта электронов через NADH:убихинон оксидоредуктазу (комплекс I), который является одним из ключевых мест их генерации в митохондриях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-00982.

1. Bobkova, N.V., et al., J. Alzheimers Dis., 2014, vol. 38, pp. 425-435.

СВЕТОИНДУЦИРУЕМЫЕ СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ HliA/HliB В КЛЕТКАХ ЦИАНОБАКТЕРИИ SYNECHOCYSTIS PCC 6803: АССОЦИАЦИЯ С ТРИМЕРАМИ И МОНОМЕРАМИ ФОТОСИСТЕМЫ 1**High-light-inducible HliA/HliB stress proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: association with photosystem 1 trimers and monomers****Акулинкина Д.В.1, Большевцева Ю.В. 1, Еланская И.В. 2, Юрина Н.П. 1**

1 – Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Москва, Ленинский пр., 33; Тел.: +7(495)958-10-70; факс: +7(495)954-27-32; e-mail: nyurina@inbi.ras.ru

2 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1, стр.12
Тел.: +7(495)939-11-79; факс: +7(495)939-43-09; e-mail: ivelanskaya@mail.ru

При высокой интенсивности света нефотохимическое тушение избыточно поглощенной энергии защищает фотосинтетический аппарат растений и цианобактерий от деструкции [1]. Важную роль в защите фотосинтетического аппарата цианобактерий от деструкции играют светоиндуцируемые стрессовые белки HliP (high-light inducible proteins) [2, 3]. Однако взаимодействие этих белков с хлорофилл-белковыми комплексами тилакоидов остается неясным. Для понимания механизма функционирования стрессовых белков HliA/HliB изучали их ассоциацию с комплексами фотосистемы 1 (ФС1) клеток дикого типа и мутантов цианобактерии *Synechocystis* PCC 6803. Методом вестерн-блоттинга обнаружено, что стресс-индуцируемые белки HliA/HliB связываются с тримерами ФС1 клеток дикого типа, выращенных на свету умеренной интенсивности (40 мкмоль фотонов/м² · с). Освещение этих клеток интенсивным светом (150 мкмоль фотонов/м² · с) в течение 1 ч вызывает увеличение содержания стрессовых белков в 1,7 раза. У мутанта *DpsaL*, лишённого тримеров ФС1, белки HliA/HliB ассоциированы с мономерами ФС1 и комплексом ФС2. Ассоциация белков HliA/HliB с мономерами, а не с тримерами ФС1 обнаружена также в клетках мутанта *Synechocystis*, лишённого ФС2, выращенных при 5 мкмоль фотонов/м² · с. При освещении интенсивным светом в клетках этого мутанта содержание белков Hli, связанных с мономерами ФС1, увеличилось в 1,2 раза. В клетках дикого типа цианобактерий, выращенных при 5 мкмоль фотонов/м² · с в присутствии 5 мМ глюкозы, стресс-белки HliA/HliB не обнаруживаются, но освещение интенсивным светом вызывает индукцию синтеза белков, которые ассоциированы с тримерами ФС1. Таким образом, выявлена ассоциация белков HliA/HliB не только с тримерами, но и с мономерами ФС1, что предполагает универсальную роль этих белков в защите фотосинтетического аппарата от избыточного света.

Авторы выражают благодарность проф. В.Ф.Д. Вермаасу (Университет Аризоны, США) за предоставление мутантов цианобактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы 1.7П Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (гранты 13-04-00533а и 12-04-00603а).

1. Karapetyan, N.V., Photosynth. Res., 2008, vol. 7, pp. 195-204.
2. Kilian, O., Steunou, A.S., Grossman, A.R., and Bhaya, D.A. Mol. Plant, 2008, vol.1, pp. 155-166.
3. Юрина, Н.П., Мокерова, Д.В., и Одинцова, М.С., Физиология растений, 2013, vol. 60, сс. 611-624.

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ОБРАЗОВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

Stimulating effect of hydrogen peroxide for chlorophyll formation

Апашева Л.М., Лобанов А.В., Рубцова Н.А., Овчаренко Е.Н., Комиссаров Г.Г.

ФГБУ науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Москва ул. Косыгина д. 4

т. 8(495) 939 73 50, факс (495) 938 24 84, E-mail: gkomiss@yandex.ru

Хлорофилл является уникальным соединением, определяющим интенсивность фотосинтеза и жизнеспособность зеленых растений, и, следовательно, их урожайность и пищевую ценность. Стимулирование образования хлорофилла сказывается на скорости роста растений – на развитие их надземной части и корневой системы.

Нами разработан простой и пригодный для сельскохозяйственных культур способ применения пероксида водорода (ПВ) для стимулирования биосинтеза хлорофилла.

Действие ПВ на образование хлорофилла испытано в условиях, приближенных к полевым. Растения кабачков, подсолнечника и картофеля выращивали на опытных и контрольных делянках. В течение двух недель интенсивного периода вегетации растения поливали из опрыскивателя (в контроле – водой, в опыте – раствором ПВ с концентрацией 10^{-5} - 10^{-3} М). Хлорофилл в опытных и контрольных растениях определяли по стандартной методике с использованием спектрофотометра НАСН-DR/4000V на длинах волн $\lambda = 662$ и 644 нм.

Наибольшее значение стимулирующего эффекта ПВ наблюдали при концентрациях ПВ 10^{-4} - 10^{-3} М. Увеличение количества хлорофилла в листьях обработанных растений составляло по отношению к контролю 20-23%, в ряде случаев достигало 40%.

Кроме обнаруженного положительного действия ПВ на общее количество хлорофилла в листьях опытных растений, выявлено увеличение отношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b*, что можно интерпретировать как достижение растением более эффективного фотосинтеза без выработки адаптивных хлорофиллов *b*.

Предложен эффективный экологически чистый способ стимуляции образования хлорофилла в процессе развития высших растений (Заявка на патент РФ «Средство для стимулирования образования хлорофилла в процессе развития высших растений и способ его применения» № 2015103632, дата поступления 04.05.2015).

ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ ФОТОСИСТЕМЫ II ИЗУЧАЕМЫЙ ПО ИЗМЕРЕНИЯМ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ НА СТАДИЯХ РОСТА КЛЕТОК CHLORELLA

The photosystem II electron transfer analyzed with the fluorescence induction data at the growth stages of Chlorella cells

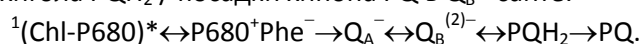
Беляева Н.Е., Конюхов И.В., Ризниченко Г.Ю., Погосян С.И., Рубин А.Б.

Биологический факультет Московского государственного университета, 119992, Москва ГСП-2, Ленинские горы

Тел.: (495)939-0289 e-mail: natalmurav@yandex.ru

Испускание флуоресценции (ФЛ) антенными комплексами фотосистемы II (ФСII) зависит от процессов транспорта электронов (e^-) ФСII [1, 2]. Кривые индукции флуоресценции (ИФ) [1], вызываемой постоянным светом, детектировали для проб водоросли Chlorella разных стадий роста в биофотореакторе (освещение $200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Образец адаптировали 10 мин к темноте перед включением света высокой интенсивности $1200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Через 5 мкс измеряли минимальный F_0 уровень ФЛ, затем нарастание до фаз перегиба кривой ИФ (ОJIP кинетика) и достижения максимума P (F_m) со спадом уровня ФЛ до $t=2$ с. Кинетика ИФ различна в зависимости от стадий роста водоросли.

Модель ФСII [3-7] применили для фитирования трех наборов параметров по ИФ «Зч», «26ч», «48ч» стадий роста Chlorella. Значения параметров совпали для реакций разделения зарядов с переносом e^- на феофитин, стабилизации на Q_A^- , накопления 2-х e^- на Q_B^{2-} , выхода пластохинола PQH_2 / посадки хинона PQ в Q_B^- сайте:



Донирование e^- от кислород выделяющего комплекса (КВК) через тирозин (Y_2) на образующий квантом света катион радикал $P680^+$ [8] задавали быстрой (~сотни нс от Y_2) и медленной (~250 мкс от S_1 состояний) компонентами [7, 8]. Параметры притока e^- от КВК одинаковы в расчете ОJIP кинетики ИФ «26ч» и «48ч» зрелой культуры. На ранней стадии роста возможно ингибирование донорной стороны ФС II, так как выявлено 20-ти кратное (~50 мс в S_1 циклах) замедление притока e^- от КВК при фитировании по «Зч» ИФ: ОК(J)P кинетика с появлением пика K $t \sim 300$ мкс и малой переменной ФЛ. Сравнение результатов фитирования по ИФ «26ч» и ИФ «48ч» показывает увеличение темновой фракции семихинона Q_B^- ФС II от 15% до 49% для позднего роста. Распределение зарядов в люмене / строме под действием света имитировано динамикой $r_{HL}(t)$, $\Delta\Psi(t)$ в виде сумм экспонент [2, 6]. Максимальная величина $\Delta\Psi(t)$ фитирована для ИФ стадии «26ч». Результаты важны для выбора стадий роста при отборе проб для измерений ФЛ.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-04-00326.

1. Papageorgiou GC, Govindjee (eds) (2004) Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. V.19
2. Bulychev A, Niyazova M, Rubin A. Biol Membrany, 1987, 4, 262-269
3. Lebedeva G, Belyaeva N, Demin O, Riznichenko G, Rubin A. Biophysics, 2002, 47, 968-980
4. Belyaeva N, Lebedeva G, Riznichenko G. Kinetic model of primary photosynthetic processes in chloroplasts. In: Riznichenko G.Yu. (ed) MCE, 2003, V. 10, 263-276 (In Russ.)
5. Belyaeva N, Schmitt F-J, Steffen R, Paschenko V, Riznichenko G, Chemeris Yu, Renger G, Rubin A. Photosynth Res 2008:98, 105-119
6. Belyaeva N, Bulychev A, Riznichenko G, Rubin A. Model of Photosystem II for the Analysis of Fast Fluorescence Rise in Plant Leaves. Biophysics, 2011, 56 (3) 464-477
7. Belyaeva N, Schmitt F-J, Paschenko V, Riznichenko G, Rubin A. Modeling of the redox state dynamics in photosystem II of Chlorella cells and leaves. Photosynth Res 2015:125, 123-140
8. Renger G. BBA, 2012:1817, 1164-1176

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ РАЗОБЩИТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Fluorescent uncouplers of oxidative phosphorylation

Денисов С.С., Коршунова Г.А., Котова Е.А., Антоненко Ю.Н.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.40
Тел.: +7(495)939-51-49; факс: +7(495)939-31-81; e-mail: antonen@genebee.msu.ru

Разобшители — это разнообразная группа низкомолекулярных веществ, способных снижать мембранный потенциал митохондрий, тем самым вызывая отключение синтеза АТФ при увеличенной скорости окисления субстратов дыхания. Согласно ранним работам из лабораторий Либермана и Скулачева, общим механизмом действия разобшителей является их способность переносить ионы водорода через липидные участки мембран митохондрий, то есть работать в качестве протонофоров. Исследования возможностей медицинского применения разобшителей показали, что эти соединения не только могут служить в качестве средств от ожирения, но в низких концентрациях защищать клетки от многих патологий, связанных с окислительным стрессом, например, при ишемии-реперфузии различных органов, диабете и др. Такое действие разобшителей связывают со значительным вкладом митохондрий в развитие окислительного стресса в клетках и резкой зависимостью скорости генерации активных форм кислорода в митохондриях от величины мембранного потенциала.

Последующие работы показали, однако, что простой механизм работы разобшителей по типу протонофора не в полной мере отражает процессы, происходящие в митохондриях. Оказалось, что действие некоторых разобшителей (например ДНФ) чувствительно к ингибиторам переносчика адениновых нуклеотидов, действие других разобшителей (например FCCP) блокируется производным холестерина б-кетохолестанолом, причем эти ингибиторы не оказывали влияния на протонофорное действие данных разобшителей в искусственных мембранных системах (или даже действовали противоположным образом). Эти данные заставили вернуться к проблеме механизма работы разобшителей, особенно в связи с важностью их терапевтических свойств. В нашей лаборатории для этой цели стали синтезироваться и изучаться разобшители на основе флуоресцирующих веществ (таких как родамин, флуоресцеин и NBD) в надежде применить их флуоресцентные свойства для измерения роли связывания с мембранами и участия протонирования в процессе разобщения.

Среди таких вновь синтезированных и изученных нами разобшителей можно перечислить додециловый и бутиловый эфиры родамина 19 (C12R1 и C4R1), додециловый эфир флуоресцеина (C12-FL), конъюгат флуоресцеина с трифенилфосфонием (mitoFluo), N-октил NBD, и другие. Все они в разной степени проявляли протонофорное действие на искусственных липидных мембранах, однако, их поведение в модельных системах и на мембране митохондрий не всегда коррелировало друг с другом. Было показано также, что mitoFluo накапливается внутри митохондрий при энергизации и высвобождается при деэнергизации. Это создает перспективу для создания мягкого разобшителя, обладающего свойством самоингибирования при сбросе потенциала митохондрий. На основании всех данных, полученных с флуоресцентными разобшителями, была высказана гипотеза о том, что действие разобшителей может быть уподоблено молекулярным клиньям, которые входят в протонные каналы дыхательных протонных помп и нарушают процесс открывания-закрывания этих каналов, необходимый для нормальной работы протонных помп.

«ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ СВЕТА В ИНТЕГРИРОВАННОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ»

Гавришева А.И.1, Лауринавичене Т.В.1, Семина В.И. 2, Цыганков А.А1

1 – Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 2

2 – ООО «Экопроект», 141000, г. Мытищи.

email: larisa_nasty@mail.ru

Сегодня в мире разрабатывается значительное количество различных технологий использования биомассы, и в частности биомассы микроводорослей, в качестве энергетических или сырьевых источников [1, 2].

Цель работы – воспроизвести интегрированную систему получения водорода, включающую свето-зависимый синтез биомассы автотрофных водорослей, темновую ферментацию биомассы и дальнейшую фотоферментацию полученной ферментационной жидкости (ФЖ) пурпурными бактериями *R. sphaeroides №7* с оценкой эффективности преобразования энергии на каждом этапе.

В данной работе показано, что на этапе синтеза биомассы автотрофных водорослей эффективность запасаения энергии в биомассе составляла в оптимальных условиях около 5 % как при выращивании хлореллы, так и при выращивании хламидомонады.

На следующем этапе нам удалось преобразовать ферментативно биомассу водорослей *C. reinhardtii* в молочную кислоту, ацетат и водород. Для этого потребовалось предварительно обработать биомассу *C. reinhardtii* методом кислотного гидролиза. Темновая ферментация биомассы прошла по пути гетероферментативного молочнокислого брожения, в результате которого наблюдали образование водорода (0,17 ммоль Н₂ /г АСБ), лактата (1,1 ммоль/г АСБ) и ацетата (0,6 ммоль/г АСБ). По теории редоксонов [3] была оценена энергетическая ценность биомассы водорослей, составляющая 14,5 кДж/г АСБ. Суммарная энергетическая ценность продуктов ферментации, включая оставшуюся глюкозу, составила 2,35 кДж/г АСБ. Таким образом, эффективность преобразования энергии на этапе ферментации составила 68%, однако эффективность преобразования энергии в водород была только 1,4%. Дополнительное количество Н₂ могло быть получено из орг. кислот, содержащихся в ФЖ, с использованием фотоферментации. Однако на стадии фотоферментации выделения водорода не наблюдали вследствие высокого содержания аммония в ФЖ. Тем не менее *R. sphaeroides №7* может расти на ФЖ, одновременно потребляя органические компоненты. Обсуждаются возможные варианты улучшения третьей фазы (фотоферментации) для увеличения выделения водорода и другие стратегии использования данной интегрированной системы для получения ценных продуктов.

Работа поддержана грантом РФФ 15-14-30007

1. Варфоломеев, С.Д., Ефременко, Е.Н., и Крылова, Л.П., Биотоплива, Успехи химии, 2010, т. 79, №6, сс. 544-564.
2. Sialve, B., Bernet, N., and Bernard, O., Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, Biotechnol. Adv., 2009, vol. 27, no. 4, pp. 409-416.
3. Minkevich, I.G. and Erohin, V.K., Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation, Folia Microbiol., 1973, no. 18, pp. 376-385.

ЭКСТРАКЦИЯ КАТИОНОВ МАРГАНЦА ИЗ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2 ГИДРОКИНОНОМ. ВЛИЯНИЕ pH, КАЛЬЦИЯ И АНИОНОВ ХЛОРА

Extraction of Mn cations from oxygen-evolving complex of photosystem 2 by hydroquinone. Effects of pH, Ca²⁺ cations and Cl⁻ anions

Давлетшина Л.Н., Сёмин Б.К., Рубин А.Б.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр.12

Тел. +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; E-mail: davlet@biophys.msu.ru

Кислород-выделяющий комплекс (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) окислительных организмов содержит в качестве каталитического центра кластер Mn_4CaO_5 , осуществляющий реакцию светозависимого окисления воды до молекулярного кислорода. Катионы марганца могут быть экстрагированы из КВК с использованием восстановителей. Общепринятыми методами экстракции катионов марганца является обработка препаратов, содержащих ФС2, Трисом или гидроксиламином. Эти соединения экстрагируют все катионы марганца из четырехъядерного каталитического центра. Другие восстановители, такие как гидрохинон или H_2O_2 , могут экстрагировать только 3 из 4 катионов марганца, т.е. появляется возможность дифференциальной экстракции катионов марганца из КВК, что может представлять существенный интерес для выяснения механизма окисления воды. В этой связи мы исследовали влияние таких факторов, как pH, Ca^{2+} и Cl^- на процесс экстракции катионов марганца гидрохиноном. Нами было обнаружено, что снижение pH (до pH 5,7) или увеличение pH (до pH 7,5) относительно оптимального значения pH для выделения кислорода (pH 6,5), приводит к ингибированию процесса экстракции: вместо 3 катионов марганца экстрагируется только 2. Таким образом, эффективность экстракции катионов марганца из КВК гидрохиноном зависит от pH и максимальная экстракция регистрируется в области pH, при которой наблюдается максимальная скорость выделения кислорода. Катионы кальция также препятствуют экстракции гидрохиноном одного катиона марганца – вместо 3 катионов Mn при pH 6,5 экстрагируется только 2 катиона Mn. Анионы хлора смещают оптимум pH выделения кислорода фотосистемой 2 в щелочную область, при этом в том же направлении смещается и pH максимальной экстракции катионов марганца гидрохиноном. Полученные результаты свидетельствуют о том, что один из катионов марганца находится под влиянием анионов хлора, катиона кальция и pH. Корреляция между pH зависимостью выделения кислорода частицами ФС2 и эффективностью экстракции чувствительного к различным обработкам катиона марганца указывает на его определяющую функциональную активность в окислении воды и/или в реакции синтеза молекулярного кислорода.

ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.), ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА**Action of plant extracts on activities of photosynthetic pigments of wheat leaves (*Triticum aestivum* L.), treated by zinc ions*****Дадашева С.Б., Байрам-заде М.Р., Атакишиева С.А., Курбанова И.М.***

Институт Ботаники Национальной Академии Наук, Азербайджан, Баку, Бадамдарское шоссе 40, AZ1073

e-mail: inna.kurbanova@yahoo.com

Исследовали влияние экстрактов лекарственных растений на фотосинтетическую активность 7-дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), в условиях стресса вызванного солью цинка в течение 24 ч в концентрации 10^{-3} М. Исследования проводили при различных pH среды выращивания. Антиоксидантную активность экстрактов, полученных из листьев шалфея (*Folia Salvia Officinalis*), корней солодки (*Radix Glycyrrhizae*) и листьев реликтового растения *Danae racemosa* определяли по отношению к стабильному радикалу в реакции DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Антиокислительную способность образца рассчитывали по компьютерной программе Perella Scientific Ins., Amherst, USA.

Концентрация вызывающая 50% ингибирование (IC50%) для тролокса, стандартного антиокислителя и тушителя радикалов составляет 17,1µг/мл. Показано, что наибольшими антиокислительными свойствами обладают экстракты листьев шалфея и корней солодки IC50% равны 11,9µг/мл, а *Danae racemosa* слабо активны и их IC50%=55,4µг/мл. Анализы спектров поглощения нативных форм хлорофиллов (Хл), показали, что в отсутствии действия соли цинка при pH 4,5 содержание Хл a и b равно 0,5. В присутствии цинка содержание Хл a и b резко подавляется. Добавление экстракта шалфея имеет защиту только Хл a, экстракт корня солодки защищает оба пигмента, а *Danae racemosa* лишь Хл b. Полученные результаты в условиях pH 6,8 показали, что экстракт шалфея не защищает пигменты, экстракт солодки защищает только Хл a, а *Danae racemosa* защищает как Хл a так и Хл b. При pH 9,0 наблюдается защита всеми экстрактами только Хл a.

На спектрофотометре Фурье фирмы Varian 640 FTIR были сняты инфракрасные спектры испытуемых экстрактов. Спектры снимались в диапазоне длин волн 4000-400см⁻¹. Определено, что во всех исследуемых нами экстрактах имеется широкая полоса поглощения с максимумом около 3400см⁻¹. Это указывает на наличие соединений с фенольным гидроксиллом. Также ей соответствует интенсивная полоса с максимумом около 1410см⁻¹, отнесенная к деформационным колебаниям связи в фенольных соединениях.

Делается вывод, что наибольшими антиоксидантными свойствами в защите фотосинтетических пигментов от ионов цинка обладают экстракты солодки и *Danae racemosa*. Данный вывод поддерживается полученными показаниями инфракрасной спектроскопии, указывающей на наличие соединений с фенольным гидроксиллом.

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОПРОДУКТИВНОСТЬ КЛЕТОК *DUNALIELLA* В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Photosynthetic bioproductivity of *Dunaliella* cells in the presence of Metylence blue

Джалилова А.Р., Али-заде Г.И., Зейналова Н.М., Халилов Р.И.

Бакинский государственный университет, AZ1148, ул. З.Халилова, 23

E-mail: qalizadeh@mail.ru

Накопление β -каротина у зеленых микроводорослей, таких как *Dunaliella salina* индуцируется сильным светом, высокой соленостью среды, дефицитом минерального питания, низкими температурами, а также искусственно, если обработать клетки красителем – генератором АФК метиленовым синим. Умеренное усиление генерации АФК у растений внешними воздействиями может приводить к повышению их устойчивости к стрессорам различной природы.

Целью работы являлось изучение биопродуктивности и биосинтеза пигментов, в частности каротиноидов, клетками *Dunaliella* в присутствии различных концентраций красителя метиленового синего при интенсивно-накопительном режиме культивирования.

Объектом исследования служила зеленая одноклеточная галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* IPPAS D-294, выделенная из соленых озер Абшерона и введенная в культуру. Водоросли выращивали при 27°C в фотореакторах (250 мл), на установке для выращивания культур одноклеточных водорослей. Содержание пигментов в клеточных экстрактах (100% ацетон) измеряли на спектрофотометре.

Выращивание контрольной суспензии клеток в оптимальных условиях (температура 27°C, интенсивность света 16 Вт/м², парциальное давление углекислоты, минеральная среда Абдуллаева - Семененко) в 250 мл стеклянных фотореакторах при интенсивном культивировании в течение 24 часов показали, что оптическая плотность контрольной клеточной суспензии увеличивается в 3,5-4 раза. При этом показатели биосинтеза пигментов ($X_{л_а}$; $X_{л_б}$; Кар.) находились на достаточно высоком уровне.

Интенсивное культивирование опытных суспензий в присутствии красителя метиленового синего (2 мкМ) показало, что темп роста и биопродуктивность водорослей снижается на 10-12%. Увеличение концентрации красителя в минеральной среде (4 мкМ) приводит к подавлению роста культуры на 23-25%. Выявлено, что при интенсивно-накопительном режиме культивирования, обработка клеток метиленовым синим (2 мкМ), увеличивает количество синтезированных пигментов, в частности хлорофиллов $X_{л_а}$ и $X_{л_б}$ соответственно на 10-12% и 18-20%. Концентрация (4 мкМ) красителя метиленового синего, снижает количество синтезированных $X_{л_а}$ на 4-5%, а $X_{л_б}$ на 12-14%. Однако, биосинтез каротиноидов в исследуемых концентрациях красителя превышает контрольные клетки при концентрации 2мкМ на 30%, а концентрации 4мкМ на 20%.

Обсуждаются механизмы подавления клеточного деления, биосинтеза каротиноидов в присутствии различных концентраций метиленового синего, а также функциональное состояние фотосинтетического аппарата водорослей.

ДЕЙСТВИЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛА НА АКТИВНОСТЬ ФС2 ПРИ ИНИЦИИРОВАНИИ ОБРАЗОВАНИЯ РФК В ХЛОРОПЛАСТАХ**Action of chloramphenicol to activity of PSII in increased content of ROS in chloroplasts*****Джафарова Дж.Р.1, Ганиева Р.А.1., Байрамова С.А.1, Гасанов Р.А.2***

1-Институт Ботаники Национальной Академии Наук, Азербайджан, Баку, Бадамдарское шоссе 40, AZ1073

2-Бакинский государственный университет, кафедра биофизики и молекулярной биологии и биотехнологии. ул.З.Халилова 23, AZ1148, Баку, Азербайджан

E-mail: j.jafarova@yahoo.com E-mail: ra38hasan@gmail.com

Исследовали активность ФС2 в листьях 10 дневных проростков тыквы (*Cucurbita pepo*), выращенных в почве в факторостатных условиях и подвергнутых окислительному стрессу, посредством опрыскивания листьев метилвиологеном (МВ). Функциональное состояние фотосинтетического аппарата оценивали *in vivo* методом замедленной флуоресценции хлорофилла a в миллисекундном временном диапазоне (мсек ЗФ Хл a). Супероксид анион радикалы, генерируемые МВ на свету на акцепторной стороне ФС1, вызывали инактивацию ФС2. Характер изменения индукционных переходов мсек ЗФ Хл a показал, что повреждению подвергались как донорная, так и акцепторная стороны электрон транспортной цепи ФС2. Нарушался процесс связанный с разделением заряда, а также стабилизация электрона на первичном хиноновом акцепторе Q_d . В этих условиях листья подвергались воздействию хлорамфеникола и оценивалась активность электрон-транспортной цепи в пределах ФС2. Было показано что, действие хлорамфеникола, без предварительной обработки МВ, идентично действию последнего, но менее агрессивно подавляло параметры мсек-ЗФ Хл a . Однако, в присутствии повышенного содержания РФК, вызванных действием МВ, эффект хлорамфеникола резко усиливался и наблюдалась полная потеря активности ФС2 после 4-6 часов воздействия.

Полагаем, что хлорамфеникол приводит к подавлению образования белка D_1 *de novo*, разрушаемого в результате окислительного стресса, нарушая, тем самым, равновесие между инактивацией реакционного центра ФС2 и синтезом новых центров.

АКТИВНОСТЬ I КОМПЛЕКСА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЖИРНОКИСЛОТНЫМ СОСТАВОМ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ

Activity complex I mitochondrial respiratory chain determined by fatty acid composition of the lipid fraction mitochondrial membranes

Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Тренина М.Б., Крикунова Н.И

ФГБУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334

ул. Косыгина, 4 . Москва, Россия

E- mail: zhigacheva@mail.ru

В настоящее время большое внимание уделяют синтезу и исследованию свойств шестичленных азотсодержащих гетероциклических соединений в качестве биологически активных соединений. Особый интерес представляют производные сим-триазина и диазина, к которым относятся меламинавая соль бис бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты (мелафен) и его пиримидиновый аналог – соль бис(оксиметил)- фосфиновой кислоты 2,4,-триаминопиримидина (пирафен). Наличие у некоторых из них антиоксидантных свойств рассматривается как одно из важнейших свойств, позволяющих использовать данные соединения для защиты растений от стрессовых воздействий т.е. применять их в качестве регуляторов роста и развития растений.

Целью данного исследования было изучение функционального состояния митохондрий 6-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum L.*), сорт Альфа в условиях недостаточного увлажнения и обработки семян 2×10^{-12} М раствором мелафена или 10^{-13} М раствором пирафена. Недостаточное увлажнение приводило к активации свободно радикального окисления в мембранах митохондрий проростков гороха, о чем свидетельствует 3-кратный рост интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ.

При этом в липидной фракции мембран митохондрий происходило снижение содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК), с 18 и 20 атомов углерода. Изменение ЖК-состава мембран митохондрий сопровождалось 1,5-кратным снижением максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 30% снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Замачивание семян гороха в 2×10^{-12} М растворе мелафена или 10^{-13} М растворе пирафена снижало образование продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков почти до контрольных значений. При этом более эффективным оказался мелафен, который предотвращал изменения в ЖК-составе мембран проростков, вызванные недостатком влаги и предупреждал нарушения биоэнергетических характеристик митохондрий. В то же время 10^{-13} М пирафен почти не оказывал защитного действия на содержание ненасыщенных C_{18} жирных кислот, но предотвращал изменения в содержании ненасыщенных C_{20} жирных кислот. Обработка семян пирафеном почти не влияла на максимальные скорости окисления НАД--зависимых субстратов митохондриями проростков в условиях недостаточного увлажнения, но эффективность окислительного фосфорилирования возросла на 15%.

На основании наших данных можно предположить, что высокая активность I комплекса дыхательной цепи митохондрий определяется антиоксидантной системой клетки, предотвращающей в условиях стресса окисление ненасыщенных ЖК с 18 атомами углерода. Вероятно, слабый защитный эффект комплекса I дыхательной цепи митохондрий пирафеном связан с тем, что он не предотвращает перекисное окисление ненасыщенных ЖК, содержащих 18 атомов углерода, но предупреждает окисление ненасыщенных ЖК, содержащих 20 атомов углерода, в мембранах митохондрий проростков в условиях недостаточного увлажнения.

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ИСТОЧНИКОВ ЭНЕРГИИ НА РОСТ НИЗШИХ ФОТОАВТОТРОФОВ**The effect of organic sources of energy on the growth of lower photoautotrophs****Жондарева Я.Д.1, Тренкеншу Р.П.1**

1 – ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, 299011, Севастополь, пр. Нахимова, 2 Тел.: +7(8692)55-07-95;

e-mail: janochka-kerch@yandex.ru

Все живые организмы нуждаются в энергии для поддержания своей жизнедеятельности и углероде для построения своей биомассы [1].

Культуры микроводорослей обычно выращивают на свету, т.е. фотоавтотрофно. Однако в обычной накопительной культуре по мере увеличения числа клеток и истощения питательной среды происходит замедление темпа деления и накопления биомассы [2]. Это можно преодолеть благодаря комбинации фотоавтотрофного и гетеротрофного метаболизма, иными словами, с помощью миксотрофного типа питания, когда источником энергии и углерода являются свет и органические вещества одновременно.

На сегодняшний день наши знания об оптимальных требованиях роста микроводорослей в миксотрофных условиях ограничены особенностями видов водорослей, которые широко используются в марикультуре.

Цель работы состояла в оценке влияния органических источников углерода и энергии на примере глюкозы и глицерина на рост *Phaeodactylum tricornutum* как представителя большинства видов морских микроводорослей, являющихся ценным источником эйкозопентаеновой кислоты.

Микроводоросли выращивали накопительным методом. Аппроксимированием экспоненциальной и линейной фаз накопительной кривой были рассчитаны кинетические характеристики роста клеток *Phaeodactylum tricornutum* (удельная скорость роста и продуктивность) [3].

Экспериментально установлено, что глюкоза и глицерин в качестве органических источников углерода и энергии в значительной степени стимулируют рост культуры *P. tricornutum* после достижения ею стационарной фазы. Определено, что для получения 1,5г сухой биомассы микроводорослей с 1л культуральной среды достаточно внести глюкозу и глицерин в количестве 11,19 и 5,775г соответственно, исходя из расчета потребностей микроводорослей в углероде. Также показано, что рост *P. tricornutum* ингибировался, когда уровень глицерина в среде при повторном его добавлении составил более 100 ммоль, что хорошо согласуется с литературными данными [5].

Таким образом, ввиду полученных результатов можно предположить, что в дальнейших опытах можно использовать, например, патоку, решая вопрос, связанный со стимулированием роста микроводорослей и проблеме утилизации побочных продуктов сахарной промышленности.

1. Бигон, М., Харпер, Дж., и Таунсенд, К., Экология. Особи, популяции и сообщества, т. 2, М.: Мир, 1989, с. 160.
2. Владимирова, М.Г.и Семененко, В.Е., Массовое культивирование микроскопических водорослей, Жизнь растений, М.: Просвещение, 1977, т. 3, сс. 367-376.
3. Тренкеншу, Р.П., Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура, Экол. Моря, 2005, вып. 67, сс. 89-97.
4. Ceron Garcia, M.C., Gacia Camacho, F., Sancheth Miron, A., Fernandez Sevilla, J.M., Chisti, Y., and Molina Grima, E., Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources, J. Microbiol. Biotechnol., 2006, vol. 16, no. 5, pp. 689-694.

СТРУКТУРА ЯДРА ФИКОБИЛИСОМЫ

The Phycobilisome Core Structure

Зленко Д.В.1, Красильников П.М.1, Стадничук И.Н.2

1 – Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова. 119234, Москва, Ленинские горы,
2 – Институт физиологии растений РАН имени К.А.Тимирязева РАН. 127276, Москва, Ботаниче-
ская, д. 35

Тел.: +7(926)6833300; e-mail: dvzlenko@gmail.com

Фикобилисомы (ФБС) – это светособирающие антенны цианобактерий, водорастворимые пигмент-белковые комплексы массой ~ 3 – 7 Мда [1]. ФБС состоит из трёхцилиндрового ядра, образованного тримерами аллофикоцианина (АФЦ), и шести боковых цилиндров, состоящих из фикоцианина (ФЦ) и фикоэритрина (ФЭ). Структура ФБС известна по данным электронной микроскопии с небольшим разрешением [1,2]. В нашей работе мы восстановили структуру ядра ФБС на основании сравнительный анализа структур различных АФЦ.

АФЦ образует тримеры α/β -гетеродимеров, имеющие форму вогнуто-выпуклой линзы и формирующие прямые и инвертированные гексамеры, контактируя вогнутыми или выпуклыми сторонами, соответственно. Среди разрешенных кристаллов АФЦ фрагментами структуры ядра ФБС являются стопки тримеров (соответствующие структуре цилиндров) и плоские слои тримеров (соответствующие взаимному расположению цилиндров). В структуре 1ALL и 3DBJ содержатся инвертированные гексамеры, упакованные в плоские слои. В кристалле 1KN1 прямые гексамеры также располагаются плоскими слоями, но их укладка отличается. Кристалл 2VJT содержит бесконечные стопки тримеров, не образующие плоских слоев. Каждая стопка состоит из прямых гексамеров, соответствующих 1KN1, состыкованных друг с другом подобно 1ALL/3DBJ. Однако, расстояние между тримерами в 2VJT на 3 – 4 Å больше, чем в 1ALL/3DBJ, что делает последний вариант структуры предпочтительным.

Совмещая в пространстве АФЦ из 1ALL/3DBJ и 1KN1 (разделяя на фрагменты по 4 тримера цепочки из 2VJT) можно построить модель цилиндра ядра ФБС. Существует два варианта: два прямых или два инвертированных гексамера. В пользу первого свидетельствует образование устойчивых прямых гексамеров ФЦ и ФЭ, а также положение белка L_{7.8} (1B33, [1]). Структура цилиндра также диктует их латеральное расположение. Если в середине цилиндра располагается инвертированный гексамер, то взаимная упаковка тримеров в соседних цилиндрах будет повторять 1ALL/3DBJ, в противном случае – 1KN1. Минимальное расстояние между хромофорами в соседних цилиндрах в первом случае составит ~35 Å, а во втором ~50 Å, что также делает предпочтительным первый вариант.

В 1ALL/3DBJ существует два варианта латерального расположения тримеров. Более подходящий можно выбрать, опираясь на модель взаимодействия ФБС с белком OCP [3], так как только в одном варианте сайт связывания OCP оказывается доступен. Требование доступности этого сайта однозначно задает положение минорных компонентов (ArcD и ArcE) в структуре ФБС. Это естественным образом определяет обнаруженную экспериментально и ранее необъясненную структурную поляризацию ядра фикобилисом [1,2].

1. Watanabe, M. and Ikeuchi, M., Photosynth. Res., 2013, vol. 116, pp. 265-276.

2. Arteni, A., et al., BBA, 2009, vol. 1787, pp. 272-279.

3. Zlenko, D.V., et al., J. Biomol. Struct. Dyn., 2015, doi: 10.1080/07391102.2015.1042913.

РОЛЬ КАРБОАНГИДРАЗ ТИЛАКОИДОВ ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ПРОЦЕССАХ ТРАНСФОРМАЦИИ СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ, ПРОТЕКАЮЩИХ С УЧАСТИЕМ ПРОТОНОВ**Roles of carbonic anhydrases situated in higher plant chloroplast thylakoids in the light energy transformation processes proceeding with proton participation*****Иванов Б.Н., Опанасенко В.К., Федорчук Т.П., Журикова Е.М., Руденко Н.Н., Игнатова Л.К.***

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино

Тел.: +7(496)773-27-15; факс: +7(496)733-05-32; e-mail: ivboni@rambler.ru

В высших растениях, согласно результатам анализа генома арабидопсиса, должно присутствовать около двадцати изоформ карбоангидраз, ферментов, катализирующих реакцию обратимой гидратации углекислого газа, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. В хлоропластах обнаружено не менее шести карбоангидраз, для большинства которых не идентифицирован кодирующий их ген. Функциональная роль ферментативной карбоангидразной активности в метаболизме этих органелл, в которых осуществляется процесс фотосинтеза, до сих пор остается гипотетической. С помощью регистрации флуоресценции хлорофилла листьев нами были исследованы характеристики преобразования световой энергии в фотосинтетической электрон-транспортной цепи растений арабидопсиса дикого типа и мутантов с нокаутированными генами альфа-карбоангидраз 2 и 4 ($\alpha\text{KA}2$ и $\alpha\text{KA}4$). Отсутствие этих карбоангидраз приводило к изменению величины эффективного квантового выхода электронного транспорта и характеристик нефотохимического тушения флуоресценции, прежде всего, вклада отдельных процессов, приводящих к этому тушению. При оптимальной концентрации CO_2 вклад процесса, инициируемого подкислением люмена, у мутантов по $\alpha\text{KA}2$ был значительно выше, а у мутантов по $\alpha\text{KA}4$ - ниже, чем у растений дикого типа. Это свидетельствует об участии карбоангидраз $\alpha\text{KA}2$ и $\alpha\text{KA}4$ в управлении процессом протонирования компонентов светособирающего комплекса Фотосистемы 2, взаимодействие которых с протонами регулирует процесс тепловой диссипации поглощенной световой энергии. Обсуждается, что недавно открытая нами карбоангидраза, расположенная в люмене тилакоидов, контролирует распределение протонов во внутритилакоидном пространстве.

Изучение участия бикарбонатного буфера в обеспечении высокой эффективности процесса фотофосфорилирования подтвердило, что увеличение содержания $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ в среде повышает скорость фотофосфорилирования в изолированных тилакоидах гороха, и показало наличие такого же повышения в тилакоидах арабидопсиса. Было обнаружено, что этот эффект повышения более выражен в тилакоидах, в которых фотофосфорилирование частично подавлено либо в результате их «старения» после выделения, либо вследствие присутствия в среде реакции разобщителя в ненасыщающих концентрациях. Степень стимулирования бикарбонатом фотофосфорилирования, катализируемого феназинметасульфатом, существенно уменьшалась в присутствии специфических ингибиторов карбоангидраз, гидрофильного ацетазоламида и липофильного этоксизоламида. Ингибирующее действие этоксизоламида было значительно сильнее, чем ацетазоламида, что предполагает участие карбоангидраз, связанных с тилакоидной мембраной или люменом, в стимулировании фотофосфорилирования при увеличении содержания $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ в среде.

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ТРИМЕРОВ ФОТОСИСТЕМЫ 1 ЦИАНОБАКТЕРИИ *THERMOSYNECHOCOCCUS ELONGATES*

Basics of Photosystem I trimers thermostability of the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*

Карапетян Н.В.1, Шубин В.В.1, Терехова И.В.1, Большевцева Ю.В.1, Регнер М.2, Копчак М.2, Ел-Мохнави Е.2, Мэнтель В.3, Джафик Е.3.

1 – ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33, корп.2

2 – Институт биохимии растений, Рур Университет, 44780 Бохум, Германия; 3 – Институт биофизики, И.В. Гете Университет, 60438 Франкфурт, Германия

Тел: +7(495)954-14-73; факс: +7(495)954-27-32, e-mail: shubin@inbi.ras.ru

Для оценки термостабильности тримеров и мономеров фотосистемы 1 (ФС1) термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* исследовали изменение вторичной структуры полипептидов этих пигмент-белковых комплексов при нагревании. Изменения регистрировали методом инфракрасной спектроскопии (Fourier transform infrared, FT-IR) при помощи Bruker VECTOR 22 FT-IR спектрометра (Bruker, Germany) и методом кругового дихроизма (КД) при помощи дихрографа Chirascan (UK). Инфракрасные спектры комплексов ФС1 записывали в области $1750-1500\text{ см}^{-1}$ при медленном нагревании образцов (1 градус за мин) от 20 до 100°C в кювете толщиной 10 мкм. Нагревание комплексов, инкубированных в течение 24 часов в D₂O фосфатном буфере (pD 7,4), сопровождалось явными изменениями в области полос Amide I ($1600-1700\text{ см}^{-1}$) и Amide II ($1500-1600\text{ см}^{-1}$). Полосы альфа-спиралей располагались при 1653 см^{-1} для мономеров и при 1656 см^{-1} для тримеров ФС1. Эти данные, а также различное соотношение амплитуд полос при 222 и 208 нм в спектрах КД альфа спиралей указывали на некоторое различие в геометрии альфа-спиралей в этих комплексах. Нагревание мономеров от 30 до 50°C приводило к уменьшению амплитуды полосы 1653 см^{-1} . При дальнейшем нагревании до 60-100°C происходило смещение максимума этой полосы до 1644 см^{-1} и дополнительное снижение амплитуды. Нагревание тримеров от 30 до 80°C вызывало лишь незначительные изменения поглощения при 1656 см^{-1} и некоторое смещение этой полосы к 1652 см^{-1} ; дальнейшее нагревание до 80-100°C приводило к сильному падению амплитуды полосы 1652 см^{-1} . Температурный профиль смещения полос альфа-спиралей в диапазоне $1653-1642\text{ см}^{-1}$ выявил две области при ~ 65 и при $\sim 85^\circ\text{C}$ для мономеров ФС1 и только одну область при $\sim 85^\circ\text{C}$ для тримеров. Изменения спектральных характеристик мономеров при $\sim 65^\circ\text{C}$, по-видимому, обусловлены как снижением доли альфа-спиральных участков, так и искажением структуры альфа-спирали. Отсутствие подобных изменений у тримеров позволяет предположить, что в первую очередь разрушаются и искажаются поверхностные альфа-спирали мономеров. В области $\sim 85^\circ\text{C}$ большая часть альфа-спиралей мономеров и тримеров переходит в нерегулярную структуру. Спектральные изменения тримеров и мономеров ФС1 при нагревании до 100°C необратимы из-за денатурации белков и неспецифической агрегации комплексов, приводящей к появлению новых полос поглощения при $1622-1624\text{ см}^{-1}$. Тримеризация мономеров ФС1, по-видимому, закрывает чувствительные к денатурации участки субъединиц мономеров, что делает олигомерную структуру более устойчивой к тепловому стрессу.

НОВЫЙ МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА АТФ. МЕХАНО-ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ**New mechanism of ATP synthesis. A mechano-chemiosmotic model**

Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.

Научно-производственный центр «КОРВЕТ», 142000, Московская область, г-о Домодедово, деревня Чулпаново, стр. 1

Тел.: +7(495)792-66-03; факс: +7(495)640-42-48; e-mail: kasumov_eldar@mail.ru

АТФ является основным интермедиатом химической энергии для существования живых организмов. Большая часть АТФ синтезируется в митохондриях, хлоропластах и бактериях в результате окислительно-восстановительных реакций. В разные годы возникали разные гипотезы - химическая, конформационная, хемиосмотическая-, позволяющие объяснить, каким образом, освобождающаяся энергия при окислении субстрата или при фотолизе трансформируется в энергию химической связи в молекуле АТФ. Однако, несмотря на большие усилия, затраченные учеными, до сих пор остается не раскрытым механизм этого фундаментального процесса, т.к. ни одна гипотеза не связывает структурные изменения органелл с переносом электронов и процессом синтеза АТФ. Мы предлагаем механо-хемиосмотическую модель сопряжения переноса электронов и синтеза АТФ, где сопряженными являются: перенос электронов по ЭТЦ, перенос протонов, передвижение катионов, низкоамплитудное набухание – сокращение и синтез АТФ [1]. Наша модель принимает основу хемиосмотической модели П. Митчелла [2] и дополняет ее динамическими свойствами, присущими биологическим структурам, учитывая регуляторную роль низкоамплитудного набухания – сокращения и передвижения ионов [3]. Предполагается, что электрон переходит от [2Fe-2S] кластера одного димера на гем c_1 (f) другого димера цитохром bc_1 (b_{cf}) комплекса, расположенного на противоположной стороне мембраны крист (тилакоида) при сокращении митохондрий или хлоропластов. Согласно этой модели, АТФ синтетаза является $Ca^{2+}/H^+ - K^+ Cl^-$ – насос-порноферментным комплексом, в котором γ -субъединица вращается по противочасовой стрелке 360° шагами 30° и 90° благодаря связыванию ионов фосфата с положительно заряженными аминокислотными остатками (аргинин и лизин) на N-концевой части γ -субъединицы в электрическом поле. Спирально скрученные b_2 -субъединицы действуют как канаты, которые укорачиваются при связывании ионов фосфата к положительно заряженным лизинам и аргининам, в результате чего $\alpha_3\beta_3$ - гексамер притягивается к мембране в процессе энергизации. АТФ синтезируется при обратном вращении γ -субъединицы и раскручивании b_2 -субъединиц дестабилизацией их структур под влиянием ионов кальция, которые перекачиваются из межмембранного пространства при его набухании.

1. Kasumov, E.A., Kasumov, R.E., and Kasumova, I.V., Photosynth. Res., 2015, vol. 123, pp. 1-22.
2. Mitchell, P., Nature, 1961, vol. 191, pp. 144-148.
3. Ленинджер, А., Митохондрия, М.: Мир, 1966, 316 с.

МЕХАНИЗМ ПЕРЕДАЧИ ЭНЕРГИИ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ АТФ

A mechanism of energy transfer in the hydrolysis of ATP

Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.

Научно-производственный центр «КОРВЕТ» , 142000, Московская область, г-о Домодедово, деревня Чулпаново, стр. 1

Тел.: +7(495)792-66-03; факс: +7(495)640-42-48; e-mail: kasumov_eldar@mail.ru

Хорошо известно, что АТФ за счет своей макроэргической связи обеспечивает энергией различные процессы, такие как активный перенос молекул через биологические мембраны, создание трансмембранного потенциала, мышечное сокращение и др. Однако до сих пор остается неясным механизм передачи энергии макроэргической связи от АТФ при его гидролизе в указанных процессах, в том числе к актин-миозиновому комплексу [1]. Мы считаем, что механизм передачи энергии при гидролизе АТФ должен быть идентичным механизму передачи энергии при синтезе АТФ в энерго преобразующих мембранах, предложенному нами в механо-хемиосмотической модели [2]. Согласно механо-хемиосмотической модели, лизины и аргинины γ -субъединицы и спирально скрученных b_2 -субъединиц АТФ-синтетазы протонируются при нейтральной величине рН за счет передвижения протонов из межмембранного пространства в матрикс. К положительно заряженным лизинам и аргининам присоединяются ионы фосфата, в результате чего происходит вращение γ -субъединицы и скручивание b_2 -субъединиц (b_2 -субъединицы действуют как канаты, которые укорачиваются и притягивают $\alpha_3\beta_3$ -гексамер к мембране в процессе энергизации) за счет электростатического отталкивания отрицательно заряженных фосфатных ионов, связанных с протонированными положительно заряженными аминокислотными остатками от депротонированных отрицательно заряженных аминокислотных остатков и от других фосфатных ионов на γ - и b_2 -субъединицах. Предлагаемый механизм синтеза АТФ позволяет понять также и механизм передачи энергии АТФ при гидролизе в АТФ-азах, в т.ч. при мышечном сокращении. Очевидно, что АТФ является переносчиком запасенного протона и иона фосфата (это и есть «макроэргическая энергия») и при гидролизе сначала отдает протон положительно заряженному остатку (или меняет рН до нейтрального значения), к которому присоединяется ион фосфата. Соединение отрицательно заряженного фосфатного иона к положительно заряженному остатку в электрическом поле позволяет выполнять механическую работу. Предположим, что начальное расстояние между зарядами e_1 и e_2 равно r_1 . Пусть оно возрастает до r_2 . Увеличение энергии системы ΔE равно работе W ,

$$\Delta E = W = e_1 e_2 (1/r_1 - 1/r_2)$$

соответствующей изменению расстояния от r_1 до r_2 .

Очевидно, знак этого выражения зависит от знака зарядов. Если заряды одноименные, то система сама может производить работу. Такая работа считается положительной и приводит к убыли энергии.

1. Kodera, N. and Ando, T., Biophys. Rev., 2014, vol. 6, pp. 237-260.
2. Kasumov, E.A., Kasumov, R.E., and Kasumova, I.V., Photosynth. Res., 2015, vol. 123, pp. 1-22.

ДЕЙСТВИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА МЕЛАФЕНА И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ SOLANUM TUBEROSUM L.**The action of growth regulator of melaphen and microelements on the photosynthetic dates of *Solanum tuberosum* L.****Кириллова И.Г.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образовательного учреждения «Орловский государственный университет», 302026, Орел, ул. Комсомольская, 95
e-mail: kaf_botany@univ-orel.ru

Исследовано совместное действие регулятора роста нового поколения – мелафена и микроэлементов (марганца и селена) – на фотосинтетические показатели растения картофеля. Мелафен является гетероциклическим и фосфорорганическим соединением, а именно, меламиновой солью бис(оксиметил)фосфиновой кислоты. Фосфиновая группировка мелафена, обладающая высокой активностью, действует подобно АТФ при контакте с внешней мембраной клетки, усиливает сигналы к осуществлению метаболических процессов. Обработку мелафеном и микроэлементами проводили путем замачивания посадочных клубней в водных растворах следующих концентраций: мелафена – 10^{-8} М, KMnO_4 – 10^{-4} М, Na_2SeO_3 – 10^{-6} М в течение 8 часов. Фотохимическую активность изолированных хлоропластов листьев растения картофеля определяли по скорости восстановления феррицианида калия, содержание пигментов – спектрофотометрическим методом. Как показали исследования, индивидуальная обработка растений картофеля регулятором роста мелафеном повышает суммарное содержание хлорофиллов «а»+ «в» в листьях (в 1,5 раза) по сравнению с контролем. Это увеличение произошло за счет хлорофилла «в», концентрация которого также возросла в 2 раза. Что касается совместной обработки мелафеном и микроэлементами (MnO_4^- и SeO_3^{2-}), то в этих вариантах опыта не отмечено существенного увеличения суммарного содержания хлорофиллов, но имеется тенденция к увеличению концентрации хлорофилла «в» при совместном действии мелафена и селенит-иона на фоне уменьшения концентрации хлорофилла «а». Концентрация каротиноидов также возросла при действии мелафена. Вместе с тем, совместное применение данного регулятора и селенит-иона, напротив, несколько понижает содержание каротиноидов, существенно повышая соотношение хлорофиллы/каротиноиды. Определение фотохимической активности изолированных хлоропластов листьев растения картофеля показало увеличение данного показателя при индивидуальной обработке регулятором роста мелафеном и при его совместном действии с микроэлементами (MnO_4^- и SeO_3^{2-}). Добавление микроэлементов существенно повысило величину фотохимической активности изолированных хлоропластов. Большой эффект на величину данного показателя оказало совместное применение мелафена и микроэлемента селена в виде селенит-иона. Таким образом, показано, что мелафен влияет на энергетические процессы фотосинтеза через регуляцию биосинтеза пигментов и активизацию работы электронно-транспортной цепи хлоропластов, активизируя работу фотосистемы II. Совместное действие мелафена и микроэлементов (MnO_4^- и SeO_3^{2-}) усиливает его эффект.

ИСКУССТВЕННЫЙ ФОТОСИНТЕЗ: КОГДА?

Artificial photosynthesis: when?

Комиссаров Г.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4
Тел. +7(495)939-7350; факс: +7(495)939-7417, e-mail: gkomiss@yandex.ru; komiss@chph.ras.ru

Первое в мире устройство, способное под действием видимого света разлагать воду с выделением молекулярного кислорода, предложено в 1966 г. [1] и в 1968 г. построено в ИХФ РАН [2]. Батарея, содержащая пленки фталоцианина на платиновых электродах, характеризовалась следующими параметрами: световой потенциал 2,4 В; фототок 50 мкА; квантовый выход фототока 0,01%. В ходе последующих работ квантовый выход фототока в батарее увеличен до 50% [3]. Таким образом в рамках традиционного уравнения фотосинтеза в абиогенной модели удалось осуществить световую стадию фотосинтеза. В работе [4] показана возможность получения органических соединений из CO₂ в фотовольтаической батарее.

В 1993 г. в ИХФ РАН предложена новая концепция фотосинтеза, подробно обоснованная в [5]. Источником кислорода (водорода) при фотосинтезе служит не вода, а экзо- и эндогенный пероксид водорода (ПВ). Под действием света в хлоропласте резко увеличивается концентрация ПВ, который переносится на реакционный центр, где происходит выделение молекулярного кислорода и увеличивается концентрация протонов, что приводит к появлению органических соединений (ОС). Термодинамические оценки показали, что синтезы ОС (формальдегида, метанола, глюкозы) из CO₂ и ПВ требуют примерно на одну треть меньших энергетических затрат, чем при использовании воды.

В 2004 г. обнаружено образование формальдегида при освещении системы: водная суспензия адсорбированного фталоцианина алюминия, 0.2 М ПВ и 0.4 М NaHCO₃ [6]. Хромато-масс-спектроскопическим методом зарегистрировано образование в этой системе спиртов и кетонов [7]. Если удалить из реакционной системы один из компонентов (ПВ, гидрокарбонат или фталоцианин), образование ОС не наблюдается.

Приведенные результаты открывают оригинальные подходы к проблеме зарождения жизни на Земле, образования ОС во Вселенной, к возможности получения ценных продуктов на основе углекислоты атмосферы.

На поставленный в заголовке вопрос окончательный ответ будет получен после изотопного подтверждения образования ОС из неорганического углерода. Как мы надеемся, это будет реализовано в ИХФ РАН в ближайшие 2-3 года.

1. Komissarov, G.G., Abstr. Second Intern. Biophysycs Congress, Austria, 1966, p. 234.
2. Комиссаров, Г.Г., Шумов, Ю.С., и Борисевич, Ю.Е., ДАН СССР, 1969, т. 187, №3, с. 670.
3. Илатовский, В.А. и Комиссаров, Г.Г., ДАН, 2008, т. 420, №1, с.66.
4. Комиссаров, Г.Г., Диссертация д.х.н., 1973, 300 с.
5. Комиссаров, Г.Г., Фотосинтез: физико-химический подход, М.: УРСС, 2003, 223 с.
6. Лобанов, А.В., Холуйская, С.Н., и Комиссаров, Г.Г., ДАН, 2004, т.399, №1, с. 73.
7. Комиссаров, Г.Г., Лобанов, А.В., Неврова, О.В., и др., ДАН, 2013, т. 453, №4, с. 406.

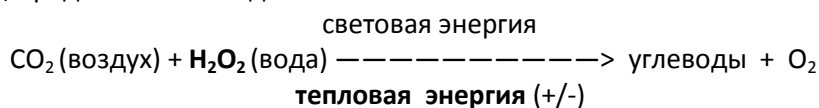
НОВОЕ УРАВНЕНИЕ ФОТОСИНТЕЗА: ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ АРГУМЕНТЫ**New equation of photosynthesis: addition arguments****Комиссаров Г.Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

Тел. +7(495)939-73-50; факс: +7(495)939-74-17 e-mail: gkomiss@yandex.ru; komiss@chph.ras.ru

Ранее в ИХФ РАН предложено новое уравнение фотосинтеза. Оно базируется на трех основных положениях: 1) в природе нет чистой воды – в ней всегда есть примесь – пероксид водорода (ПВ); 2) изотопные опыты по выделению кислорода *in vivo*, выполненные А.П. Виноградовым и М.В. Кутюриным, находятся в полном соответствии с экспериментом, если принять, что O_2 выделяется из ПВ; 3) генерация фототока в фотовольтаической батарее – функциональной модели хлоропласта – обусловлена разложением пероксида водорода [1, 2].

Анализ литературных данных и выполненные нами оценки показали, что в хлоропласте на каждую молекулу хлорофилла приходится одна молекула ПВ. Энергия связи ПВ с димерами хлорофилла на 3,8 ккал/моль больше, чем у воды (квантомеханические расчеты). Согласно новой концепции фотосинтеза источником кислорода (водорода) в фотосинтезе является не вода, а ПВ экзо- и эндогенного происхождения. Под действием света в хлоропласте увеличивается концентрация ПВ, который переносится на реакционный центр, где происходит выделение молекулярного кислорода (константа разложения ПВ на соединениях марганца много больше, чем на хлорофилле). Это приводит к возрастанию концентрации протонов и появлению первичных продуктов. Тепловая энергия – не «отброс фотосинтеза», а необходимый участник процесса. Основное уравнение фотосинтеза, где жирным шрифтом выделены внесенные нами поправки, представлено в виде:



Знак **(+/-)** в уравнении означает, что при высокой интенсивности света лист отдает тепловую энергию в окружающую среду, а при низкой – отбирает ее от окружающей среды.

Предложенная концепция позволила дать логичное объяснение роли транспирации и тепловой энергии при фотосинтезе. На ее основе нами получены практически значимые результаты (шесть патентов). Реализован новый подход к проблеме искусственного фотосинтеза [3], преобразования солнечной энергии в электрическую [4], повышения продуктивности сельскохозяйственных растений [5].

1. Komissarov, G.G., Abstr. 11th Intern. Biophys. Congr. Hungary, 1993, p. E1.41.
2. Комиссаров, Г.Г., Фотосинтез: физико-химический подход, М.: УРСС, 2003, 223 с.
3. Комиссаров, Г.Г., Лобанов, А.В., Неврова, О.В., и др., ДАН, 2013, т. 453, № 4, с. 406.
4. Komissarov, G.G., Molecular and Nanoscale Systems for Energy Conversion, Varfolomeev, S. and Krylova, L., Eds., Nova Science Publishers, Inc., 2008, pp. 37-45.
5. Комиссаров, Г.Г., в сб. Инновационные направления современной физиологии растений, М., 2013, с. 18.

ФОСФОРЕСЦЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА В ПИГМЕНТНОМ АППАРАТЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

Phosphorescence analysis of the chlorophyll triplet state in the pigment apparatus of chloroplasts

Красновский А.А.1,2

1- Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп. 33, к. 2, РФ

2 – Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899, Ленинские горы, РФ

Тел.: +7(495)954-14-72; e-mail: phoal@mail.ru

Фосфоресценция пигментов сопровождается прямой излучательную дезактивацию их триплетных состояний, т.е. является фундаментальным фотофизическим свойством пигментных молекул. Первые достоверные измерения фосфоресценции в замороженных (77К) растворах хлорофиллов были выполнены в группе автора в 1973-1975 гг и позже подтверждены во многих лабораториях. Фосфоресценция хлорофиллов в пигментном аппарате растений была впервые измерена в 1975 г. (40 лет назад). До настоящего времени эти измерения никем не повторены. Тем не менее, анализ фосфоресценции дает уникальную информацию об энергии, эффективности заселения, и кинетических свойствах триплетных состояний пигментов растений и первичном механизме фотоокислительного стресса в растениях. В докладе предполагается кратко суммировать свойства выявленных с помощью фосфоресценции триплетных состояний мономерных димерных и олигомерных молекул Mg-содержащих пигментов (протохлорофилла, хлорофиллов *a* и *b*) и их безмагниевого аналогов, а также способности этих пигментных форм фотогенерировать синглетный кислород в аэробных условиях. Показано, что в фиксированных жидким азотом этиолированных и зеленеющих листьях на ранних стадиях зеленения, когда отсутствует взаимодействие между каротиноидами и хлорофиллом, миллисекундные триплетные состояния эффективно заселяются несколькими формами протохлорофилла (*ида*) и хлорофиллом *a*. В сформированных листьях и хлоропластах миллисекундная фосфоресценция хлорофилла на три порядка слабее, чем на начальной стадии зеленения. Следовательно, в нормальных хлоропластах фосфоресценция определяется небольшой фракцией молекул хлорофилла, сопряженных с комплексом светособирающих пигментов, но не способных к передаче энергии триплетного состояния каротиноидам. Показано, что именно эта фракция определяет фотодинамическое повреждение хлоропластов под действием яркого солнечного света. Выполнено детальное изучение природы этой фракции путем выделения пигмент-белковых комплексов. В частности, недавно удалось надежно измерить фосфоресценцию хлорофилла в изолированных комплексах РЦ ФС-2, в которых каротиноиды пространственно отделены от первичного донора Р680. Установлено, что в этих образцах фосфоресценция генерируется за счет обратной рекомбинации разделенных зарядов. Предполагается обсудить результаты экспериментов по фракционированию хлоропластов.

1. Krasnovsky, A.A. Jr., Handbook of Porphyrin Science, Kadish, K.M., Smith, K.M., and Guillard, R., Eds., 2014, Singapore: World Scientific Publishing, vol. 33, part 2, pp. 78-165.
2. Krasnovsky, A.A. Jr. and Kovalev, Yu.V., Biochemistry (Moscow), 2014, vol. 79, pp. 349-361.
3. Neverov, K.V., Krasnovsky, A.A. Jr., Zabelin, A.A., Shuvalov, V.A., and Shkuropatov, A.Ya., Photosynth. Res., 2015, vol. 125, pp. 43-49.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАН В КЛЕТКАХ МУТАНТОВ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII С НАРУШЕНИЕМ ТЕМНОВОГО БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА**Structural and functional organization of membranes in the cells of mutants *Chlamydomonas reinhardtii* with blocking dark chlorophyll biosynthesis****Ладыгин В.Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 2

Тел.: +7(4967)73-28-64; e-mail: ladyginv@rambler.ru

Целью данного исследования было выяснить как влияет генетическое нарушение биосинтеза хлорофилла в темноте на уровне протопорфирина IX на нарушение мембранных структур в клетках мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* и их восстановление на свету.

Клетки зеленой водоросли *Ch. reinhardtii*, несущие аллельные мутации (*brc-1* и *lts-3*) в гене *LTS3* в темноте, накапливали красные предшественники хлорофилла – протопорфирин IX и Mg-протопорфирин IX. Они формировали колонии оранжевого цвета в темноте, которые зеленели на свету. Ген *LTS3* кодирует ДНК-связывающий белок, который является фактором транскрипции, активирующим экспрессию генов Mg-хелатазы. Эти данные указывали на то, что у *Ch. reinhardtii* регуляция темнового биосинтеза хлорофилла осуществляется не только на этапе превращения протохлорофиллида, но и на более ранней стадии синтеза пигмента протопорфирина IX – путем транскрипционной регуляции генов Mg-хелатазы. Исследования мутантов *Ch. reinhardtii*, накапливающих в темноте протопорфирин IX – субстрат Mg-хелатазы, позволили идентифицировать 2 ядерных гена: *LTS3* и *CHLH*. Исследования показали, что ген *CHLH* *Ch. reinhardtii* кодирует большую субъединицу Mg-хелатазы. Мутации в гене *CHLH* (*brs-1* и *chl-1*) вызывали гибель клеток на свету.

Изучено изменение структурно-функциональных характеристик клеток дикого типа СС-124 и мутанта *Brc-1* *Ch. reinhardtii* в темноте и на свету. Показано, что клетки дикого типа СС-124 имели хорошо развитую структуру и высокую функциональную активность, благодаря их способности синтезировать хлорофилл как на свету, так и в темноте. У мутанта *Brc-1* в клетках, растущих на свету, плазмалемма имеет четкую трехслойную структуру и двухслойную мембраны оболочки ядра, митохондрий и хлоропластов. В клетках мутанта *Brc-1*, выросших в темноте, как плазмалемма, так и мембраны ядра, митохондрий и хлоропластов едва различимы и имеют прерывистую структурную организацию. «Разрыхление» всех мембранных структур клетки связано с мутацией регуляторного гена *brc-1*, контролирующего активность фермента Mg-хелатазы. Мутант *Brc-1* утратил способность синтезировать хлорофилл в темноте в результате мутации в гене *brc-1*, блокирующей синтез фермента Mg-хелатазы. В темноте он накапливал много протопорфирина IX и имел редуцированную мембранную систему и низкую функциональную активность [1]. Обсуждаются причины столь существенных нарушений структуры и функции в клетках мутанта *Brc-1* в темноте и восстановления их на свету, так как световой синтез хлорофилла у них не нарушен. Предполагается, что регуляторный ген *brc-1*, помимо блокировки активности фермента Mg-хелатазы, может нарушать ранние этапы биосинтеза глицеролипидов, не затрагивая при этом цепь биосинтеза каротиноидов.

1. Ладыгин, В.Г., Чекунова, Е.М., Семенова, Г.А., и Кособрюхов, А.А., Биофизика, 2014, т. 59, №4, сс. 692-703.

СВЕТОЗАВИСИМЫЙ СИНТЕЗ МЕМБРАН У МУТАНТА Brc-1 CHLAMYDOMONAS REINHARDTII С НАРУШЕНИЕМ РЕГУЛЯТОРНОГО ГЕНА BRC-1 MG-ХЕЛАТАЗЫ

Light-dependent synthesis of membranes in mutant Brc-1 Chlamydomonas reinhardtii with blocking of regulatory gene brc-1 of Mg-chelatase

Семёнова Г.А.1, Ладыгин В.Г.2

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 2;

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)73-28-64; e-mail: ladyginv@rambler.ru

Ранее было установлено, что в клетках мутанта Brc-1 в темноте не формируется нормальная структура мембран всех органелл клетки [1]. Представляло интерес изучить, как быстро влияет кратковременное освещение клеток на восстановление мембранных структур.

Исследование проведено на клетках мутанта Brc-1 одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В работе впервые установлено, что темновой биосинтез хлорофилла в клетках *Ch. reinhardtii* регулируется на уровне транскрипции – путем активации генов, кодирующих фермент Mg-хелатазу. Установлены ядерные гены *LTS3* и *brc-1*, кодирующие факторы транскрипционной активации Mg-хелатазы в темноте.

Изучена структурная организация клеток мутанта Brc-1 одноклеточной зеленой водоросли *Ch. reinhardtii*, выращенной в темноте и на свету в течение 1 мин, 6 мин и непрерывного освещения. Мутант Brc-1 несет мутацию *brc-1* в ядерном гене *LTS3*. На свету в его клетках все мембранные структуры нормально формируются и хорошо развиты. В темноте клетки мутанта Brc-1 хорошо растут и делятся, но при этом, все их клеточные мембраны: плазмалемма, тонопласт, митохондриальные мембраны, мембраны оболочки ядра и хлоропласта, тилакоиды и мембраны диктиосом аппарата Гольджи не выявляются с помощью электронной микроскопии. Показано, что даже кратковременное освещение клеток мутанта Brc-1 в течение 1 или 6 мин приводит к существенному восстановлению всех вышеперечисленных мембранных структур. Детально изучено формирование плазмалеммы клеточной стенки мембран митохондрий, хлоропластов и ядра, а также везикул эндоплазматического ретикулума аппарата Гольджи и восстановление редуцированных гранул глазного пятна. Предполагается, что в клетках мутанта Brc-1 в темноте нарушен не только биосинтез хлорофилла на уровне протопорфирина IX, но и ранние этапы биосинтеза глицеролипидов. Обсуждаются возможные причины наблюдаемых нарушений в структуре мембран у мутанта Brc-1 в темноте и быстрый светозависимый синтез и восстановление их на свету. Предполагается, что нарушение мембранных структур у мутанта Brc-1 в темноте связано не только с нарушением биосинтеза хлорофилла, но и, возможно, с нарушением биосинтеза ранних этапов глицеролипидов. Биосинтез каротиноидов у мутанта Brc-1 не нарушен.

1. Ладыгин, В.Г., Чекунова, Е.М., Семенова, Г.А., и Кособрюхов, А.А., Биофизика, 2014, т. 59, №4, сс. 692-703.

СИСТЕМЫ NIKON ВЫСОКОГО И СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ЖИВЫХ КЛЕТОК**Nikon High- and Super-Resolution microscope systems offer new approaches to live cell imaging*****Лемак М.С.1***

1 – ООО «Никон», 2-й Сыромятнический пер., д.1, Москва, Россия

Тел.: +7(915)173-43-40; e-mail: maria.lemak@nikon.ru

Компания Никон является известным производителем широкой линейки световых микроскопов, от простых «рабочих лошадок» для рутинных исследований до высокотехнологичных конфокальных микроскопов и систем визуализации, позволяющих получать изображения с нанометровым разрешением.

Недавно на базе исследовательского инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E была создана уникальная модульная система Ti-LApp, которая позволяет объединять одном микроскопе несколько инструментов для разноплановых исследований. Так, например, в систему Ti-LApp входит новое техническое решение N-STORM 4.0, основанное на методе стохастической оптической реконструкции, и позволяющее исследовать клеточные структуры и динамические процессы в живых клетках в субдифракционном диапазоне.

Кроме того, система управляемого позиционированного освещения на основе технологии DMD (Digital Mirror Device), также входящая в состав системы Ti-LApp, позволяет одновременно освещать в поле зрения область любой заданной формы, площадью от долей микрона, и является незаменимым инструментом для исследований, связанных с фотостимуляцией, фотоактивацией и фотоконверсией флюоресцентных белков и красителей. Благодаря сочетанию данной системы с конфокальными микроскопами с вращающимся диском CrestOptics, компания Никон может предложить новую доступную высокоскоростную и высокоточную интегрированную систему для оптогенетических исследований на культурах клеток под единым управлением программного обеспечения NIS Elements.

Таким образом, объединение различных модулей в системе Ti-LApp открывает широкие возможности для применения методов корреляционной флюоресцентной микроскопии для реализации новых идей в исследовании взаимосвязей клеточных структур и функций.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ОБРАЗОВАНИИ И РАЗЛОЖЕНИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Photochemical activity of chlorophyll in formation and decomposition of hydrogen peroxide

Лобанов А.В., Комиссаров Г.Г.

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4
Тел.: +7(495)939-73-50; факс: +7(495)938-24-84; e-mail: gkomiss@yandex.ru

Определение фотохимической активности хлорофилла (Хл) во взаимопревращении активных форм кислорода важно для выявления ключевых стадий в механизме природного фотосинтеза.

Рассмотрены процессы образования и распада H_2O_2 в насыщенных кислородом воздуха системах, содержащих Хл и производные хлорофилла (ПХ) при освещении. Облучение проводили светом галогенной лампы в комплекте с линзами, конденсором и светофильтром КС-13, отсекающим излучение с $\lambda < 630$ нм, в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Мощность светового потока составляла 20-80 мВт/см². Проанализированы мицеллярные, липосомальные и белковые системы на основе Хл, растворы Хл и ПХ в CCl_4 , $CHCl_3$, EtOH с добавками воды (смешанные или двухфазные системы) и водные суспензии кремнеземов с адсорбированным Хл. Квантово-химические расчеты комплексов ПХ... O_2 и ПХ... H_2O_2 выполнены с набором базисных функций 6-31G** в DFT-приближении с использованием обменно-корреляционного функционала PBE1PBE в программе Gaussian 03 и другими методами.

Интермедиаты и продукты фотохимической активации кислорода в присутствии Хл – это 1O_2 , HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 [1]. Расчеты энергии взаимодействия Хл с молекулами кислорода показали, что Хл и ПХ могут выступать в качестве эффективных фотосенсибилизаторов 1O_2 , термические реакции которого приводят к образованию H_2O_2 . Кинетика этих процессов зависит, главным образом, от агрегационной формы Хл. Рассмотрены стадии процесса, зависящие от pH и присутствия нуклеофильных веществ [2]. Генерация H_2O_2 (наиболее стабильной частицы из АФК) происходит до концентраций $\sim 10^{-4}$ М. Фотохимическая активность Хл в образовании H_2O_2 увеличивается для мономерной формы Хл, тогда как координация и разложение H_2O_2 , напротив, эффективно происходят в присутствии агрегатов Хл [3]. Расчетами модельных систем $Хд_n$ ($Хд$ – хлорофиллид, $n = 2, 3$) выявлены их предпочтительные структуры, их геометрия, энергия связывания и активные центры координации H_2O_2 .

Результаты работы показывают, что изолированные и агрегированные формы хлорофилла принимают участие в различных превращениях активных форм кислорода. Рассмотренные реакции представляют интерес при обсуждении механизма выделения кислорода в фотосинтезе, а также при разработке искусственных систем для запасаения и преобразования энергии [3].

Работа выполнена при поддержке программой Президиума РАН № 28.

1. Лобанов, А.В., Рубцова, Н.А., Веденева, Ю.А., и Комиссаров, Г.Г., Докл. РАН, 2008, т. 421, сс. 773-776.
2. Лобанов, А.В. и Комиссаров, Г.Г., Биофизика, 2013, т. 58, сс. 64-69.
3. Лобанов, А.В. и Комиссаров, Г.Г., Биофизика, 2014, т. 59, сс. 215-230.

ИНГИБИРУЮТ ЛИ АНИОНЫ ФТОРА ТОЛЬКО КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩИЙ КОМПЛЕКС В ФОТОСИСТЕМЕ 2?**Do fluoride anions inhibit only oxygen-evolving complex in photosystem II?****Ловягина Е.Р., Сёмин Б.К.**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: +7(495)939-33-15; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Каталитический центр в фотосистеме 2 (ФС2) кислородных организмов (высшие растения, зеленые водоросли, цианобактерии) осуществляет одну из важнейших биоэнергетических реакций, а именно, фотоокисление воды, которое сопровождается выделением молекулярного кислорода в атмосферу. Эта реакция является практически единственным источником O_2 на планете. Несмотря на ее исключительное значение для жизни на Земле и многочисленные исследования, до сих пор нет понимания механизма этой фундаментальной реакции. Каталитический центр, осуществляющий окисление воды и синтез молекулярного кислорода, состоит из 4 катионов марганца и одного катиона кальция, соединенных между собой 5 атомами кислорода [1, 2]. В работе каталитического центра участвуют также анионы хлора. В этой связи были проведены исследования возможности замещения анионов хлора анионами других галогенов. Было установлено, что анионы хлора могут быть замещены анионами брома без значительного эффекта на функциональную активность кислород-выделяющего комплекса (КВК). Анионы йода менее эффективны в замещении анионов хлора. Анионы же фтора действуют как антагонисты анионов хлора. В соответствии с этими результатами была сформулирована концепция, согласно которой анионы фтора замещают анионы хлора в КВК, что приводит к ингибированию реакции выделения кислорода.

В нашей работе мы более детально исследовали механизм действия анионов фтора на функциональную активность ФС2. Мы установили, что при добавлении к нативным препаратам ФС2 анионы фтора ингибируют ее активность в целом, но в первую очередь реакцию выделения кислорода. Ингибирование реакции выделения кислорода происходит более интенсивно ($C_{50\%} = 40$ мМ), чем ингибирование реакции электронного транспорта от донорного участка ФС2 к экзогенному акцептору электронов на акцепторной стороне ФС2 – 2,6-дихлорфенолиндофенолу (ДХФИФ) ($C_{50\%} = 160$ мМ). Полученный результат фактически означает, что анионы фтора вызывают эффект «разобщения» электронного транспорта и реакции выделения кислорода, наблюдаемый также при экстракции катионов кальция из ФС2 [3]. В последующей серии экспериментов мы исследовали влияние анионов фтора только на электронный транспорт, используя частицы ФС2 без кальция в КВК, в которых реакция окисления воды осуществляется, но не до молекулярного кислорода, а до перекиси водорода [4]. Мы обнаружили, что электронный транспорт в ФС2 без кальция ингибируется анионами фтора ($C_{50\%} = 30$ мМ). Более того, анионы фтора снижают скорость электронного транспорта (восстановление ДХФИФ) и в частицах ФС2 без марганца (в присутствии экзогенного донора электронов дифенилкарбазида) ($C_{50\%} = 25$ мМ). Полученные результаты свидетельствуют, что анионы фтора ингибируют не только работу КВК, но также электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2.

1. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J-R., and Kamiya, N., Nature, 2011, vol. 473, pp. 55-60.
2. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., et al., Nature, 2014, vol. 517, pp. 99-103.
3. Semin, B.K., Davletshina, L.N., et al., Photosynth. Res., 2008, vol. 98. pp. 235-249.
4. Semin, B.K., Davletshina, L.N., et al., Photosynth. Res., 2013, vol.117, pp. 385-399.

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ВИРТУАЛЬНОМУ МОДЕЛИРОВАНИЮ БИОЭНЕРГЕТИКИ МИТОХОНДРИЙ

Novel approach in a virtual modeling of mitochondrial bioenergetics

Машковцева Е.В., Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р.

Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14.

Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail: elenamash@gmail.com.

Энергетическое состояние клетки является одним из важнейших показателей ее функционального состояния. Своевременный адекватный синтез энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ) и его дальнейшее распределение обеспечивают физиологический уровень функциональной активности клеток, тканей, организма. Инвазивность и высокая стоимость стандартных методов оценки внутриклеточных процессов привели к развитию теоретических подходов к анализу энергосинтезирующих систем.

В клетках млекопитающих основными мембранными белками, ответственными за обеспечение клетки энергией, являются FoF1-АТФсинтаза и АТФ/АДФ-антипортер. Теоретическое описание каталитического цикла АТФсинтазы на основе структурных данных с применением различных математических подходов [1] позволяет оценивать количество АТФ, производимое в заданных условиях одним белком или их некоторым количеством. Симуляция как синтеза, так и гидролиза АТФ позволяет анализировать функциональное состояние митохондрий в различных условиях. Однако скорость синтеза и потребления аденилатов регулируется также работой АТФ/АДФ-антипортера [2], механизм работы которого изучается уже многие годы. В нашей системе единичный переносчик нуклеотидов был описан с помощью стохастического моделирования, при этом величины коэффициентов вероятностей элементарных шагов транспортного цикла зависели также от структурных особенностей белка. Подобный подход позволил оценить различные каталитические схемы работы переносчика, а также влияние параметров на эффективность транспорта нуклеотидов в «правильном» направлении. Теоретическая оценка как скорости синтеза и гидролиза АТФ, так и транспорта нуклеотидов позволяет достаточно полно описать энергетическое состояние клетки без применения инвазивных методик, а возможность прицельного моделирования единичных белков позволяет осуществить точную настройку системы для различных условий.

1. Mashkovtseva, E.V., Boronovsky, S.E., and Nartsissov, Ya.R., *Mathematical Biosciences*, 2013, vol. 243, pp. 117-125.
2. Klingenberg, M., *BBA*, 2008, vol. 1778, pp. 1978-2021.

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ОЛИГОМЕРОВ ПОРФИРИНА, СВЯЗАННЫХ ТРИАЗОЛЬНЫМ МОСТИКОМ, И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ ФАЗОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ВОЗБУЖДАЮЩЕГО ИМПУЛЬСА**Femtosecond Dynamics of Oligomers of Porphyrin Bonded Triazole Bridges, and the Influence of the Phase Characteristics of the Excitation Pulse*****Михайлов К.М.1, Букреев А.В.1, Шелаев И.В.1, Гостев Ф.Е.1, Надточенко В.А.1****1-ИХФ РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4**Тел.: +7(495)939-73-47; e-mail: silphidae@gmail.com*

Значительный интерес исследователей по отношению к биспорфириновым соединениям основан на том, что к биспорфиринам относится ключевой элемент фотосинтеза, представляющий собой конструкцию из двух копланарно ориентированных порфириновых фрагментов [1]. Моделирование фотосинтетического центра искусственно созданными биспорфиринами позволит раскрыть механизм высокоэффективного преобразования солнечной энергии фотосинтетическими комплексами [2].

Фемтосекундные эксперименты были выполнены на установке, собранной в ИХФ РАН. Дифференциальные спектры поглощения олигомеров порфирина регистрировались в спектральном диапазоне 400-800 нм при возбуждении фемтосекундным импульсом с несущей на 610 нм. В дифференциальных спектрах можно выделить полосы поглощения из электронно-возбужденных состояний, полосы вынужденной люминесценции из электронно-возбужденных состояний, полосы выцветания. Полосы выцветания в дифференциальных спектрах обусловлены обеднением основного состояния комплексов за счет возбуждения комплексов. В дифференциальном спектре около В полосы наблюдается расщепление полосы выцветания на два пика (около 420 и 430 нм), которые соответствуют пикам выявленным в производных спектра поглощения. Расщепление выражено значительно сильнее в случае биэкситонного возбуждения. Относительная интенсивность двух пиков выцветания существенно изменяется во времени, и рост одного из пиков сопровождается падением интенсивности второго пика.

Впервые в фемтосекундной динамике биспорфириновых систем обнаружены осцилляции, которые идут в противофазе для двух пиков в полосе выцветания В. Спектр мощности осцилляций, полученный Фурье преобразованием, показывает пик $1,17 \cdot 10^{13}$ Гц, что соответствует 390 см^{-1} , и его спутник, 371 см^{-1} . Осцилляции указывают на когерентную динамику в полосе Core.

При изменении фазовых характеристик возбуждающего импульса (чирпа) динамика димра и тримера биспорфирина меняется. Так в случае положительного чирпа возбуждающего импульса в спектрах Фурье можно обнаружить появление частоты $\sim 790 \text{ см}^{-1}$, которая является либо удвоенной частотой, либо новой. В случае отрицательного чирпа существенных изменений в фемтосекундной динамике не наблюдается.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ №14-03-31370.

1. Shipman, L., Cotton, T.M., Norris, J.R., and Katz, J.J., Proc. Natl. Acad. Sci., 1976, vol. 73, no. 6, pp. 1791. Harvey, P.D., Stern, C., Gros, C.P., and Guillard R., Coordination Chemistry Reviews, 2007, vol. 251, nos. 3-4, pp. 401-428.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА КЛЕТОК *EUGLENA GRACILIS* ПРИ МИКСОТРОФНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

The functional state of the photosynthetic apparatus of *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation

Мокросноп В.М., Полищук А.В., Золотарёва Е.К.

Институт ботаники им. М.Г.Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, 01004, Киев, ул. Терещенковская, 2; Украина
Тел/факс + 380(44)2723231; email: membrana@ukr.net

E. gracilis способна ассимилировать на свету экзогенные источники углерода, в частности, этанол и глутамат. Этанол катаболизируется в митохондриях и цитоплазме клеток *E. gracilis* с образованием двух молекул восстановленного НАДН и одной молекулы ацетата [1]. Избыток восстановительных эквивалентов может направляться в пластиды, изменяя редокс-состояние фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Из-за стимуляции митохондриального дыхания содержание кислорода в среде инкубации *E. gracilis* значительно снижается и, как следствие, замедляются окислительные процессы в клетках. В этих условиях в хлоропластах *E. gracilis* регистрируется темновое восстановление пластохинонового пула (ПХП) при участии НАДН-дегидрогеназы, вызванное замедлением окисления пластохинона (Пх) терминальной хлоропластной оксидоредуктазой при дефиците кислорода. Ранее было показано, что восстановление Пх ускоряется в анаэробных условиях [2], но кинетика этого процесса осталась не исследованной. Целью данной работы был анализ состояния фотосинтетического аппарата и кинетики изменений редокс-состояния Пх в миксотрофных культурах *E. gracilis*, выращенных в присутствии этанола или смеси этанола и глутамата.

Микроводоросли *E. gracilis* var. *Vacillaris* культивировали автотрофно в течение 6 суток на жидкой минеральной среде (Cramer and Myers, 1952) при интенсивности освещения 100 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и температуре 27 °С. На 7-е сутки к аликвотам суспензии добавляли субстраты: этанол (100 мМ), метанол (100 мМ), смесь этанола (100 мМ) с глутаматом натрия (40 мМ). Темновое восстановление ПХП, коррелирующее со степенью восстановленности первичного хинонового акцептора Q_A, исследовали методом индукции флуоресценции хлорофилла а. Определяли минимальное (F₀) и максимальное (F_m) значения флуоресценции хлорофилла и вычисляли максимальный квантовый выход фотосистемы 2 (ФСII) (F_v / F_m), фотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла (qP) и эффективный квантовый выход ФСII (Ф_{PSII}). Для оценки изменения положения светособирающих комплексов фотосинтетический аппарат *E. gracilis* в течение 10 минут темновой инкубации возбуждали насыщающими вспышками с интервалом в 2 минуты. Исследование влияния экзогенных источников углерода на развитие темнового нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла показало, что со временем темновой инкубации в миксотрофных культурах *E. gracilis* происходит постепенное снижение максимального значения флуоресценции, что свидетельствует об уменьшении способности ФСII поглощать энергию света. Сделан вывод, что добавление этанола в качестве субстрата при миксотрофном культивировании *E. gracilis* повышает скорость фотосинтетического транспорта электронов в клетках; после инкубации *E. gracilis* с субстратами на свету активируется темновое восстановление ПХП, сопровождающееся снижением способности ФСII к поглощению световой энергии

1. Yaval-Sanchez, B., Jasso-Chavez, L.-S. et al., J. Bioenerg. Biomembr., 2011, vol. 43, pp. 519-530.

2. Nellaepalli, S., Kodru, S., et al., PLoS ONE, 2012, vol. 7, no. 11. doi:10.1371/journal.pone.0049839.

МЕТАСТАБИЛЬНЫЕ ДИПОЛЬСВЯЗАННЫЕ АНИОНЫ В ПЕРЕНОСЕ ФОТОИНЖЕКТИРОВАННОГО ЭЛЕКТРОНА МЕЖДУ ВЗАИМНО УДАЛЕННЫМИ ДОНОРОМ И АКЦЕПТОРОМ В ВОДНОЙ ЗАМОРОЖЕННОЙ СРЕДЕ**Visualization of dipole bound anions in photo transfer in frozen water media****Неделина О.С., Бржевская О.Н., Дегтярев Е.Н., Чернозатонский Л.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

E-mail: chembio@sky.chph.ras.ru

В водном замороженном супрамолекулярном комплексе, в которой пара хромофор и тушитель- акцептор связаны между собой водородными связями, наблюдаются высокая скорость и направленность транспорта фотоинжектированного электрона между нековалентно связанными донором и акцептором. В этом комплексе исключены обычные диффузионные активационные механизмы и подвижен только электрон, что позволяет проследить его поэтапную трансформацию методом ЭПР, выявляя химические интермедиаты электронной тропы между донором и акцептором.

Мы представляем прямое участие дипольсвязанных анионов в переносе инжектированных низкоэнергетических фотоэлектронов (ближний УФ $240\text{nm} \leq \lambda \leq 400\text{nm}$) между донором и акцептором $D^+ \cdot [MN]^- \cdot A$. Короткоживущие метастабильные дипольсвязанные анионы, промежуточное существование которых обусловлено взаимодействием дипольного момента с кулоновским полем электрона, полагаются переходным состоянием в двухступенчатой элементарной химической реакции диссоциативного переноса электрона: захват и диссоциация электрона.

Возникновению дипольсвязанных анионов $[MN]^-$ способствует повышение дипольного момента молекулярного комплекса за счет образования водородных связей. На основе экспериментальных данных установлена линейная корреляция между степенью переноса заряда и энергией межмолекулярных Н-связей, являющаяся важным доводом в пользу донорно-акцепторной природы последних.

Регистрации методом ЭПР катион радикала донора и анион радикала акцептора ($D^+ \cdot MN-A^-$) только в присутствии поляризующихся электролитов MN и фрагментов дипольсвязанных анионов в системе $D^+ \cdot [MN]^-$, в которой перенос электрона на акцептор блокирован тем или иным способом, визуализует основные свойства дипольсвязанных анионов: автоотщепление электрона в присутствии акцептора: $[MN]^{*+} + A \rightarrow MN^- + A^+$ или диссоциацию-фрагментирование по одному или нескольким направлениям с образованием специфических фрагментов $[MN]^{*+} \rightarrow M^- + H^+$.

Обнаружение прямого акцептирования низкоэнергетического электрона электролитами с функциональными группами OH, COOH и NH₂, активированными водородными связями и создающими в среде от донора к акцептору направляющую электронную тропу из метастабильных дипольсвязанных анионов, позволяет обсуждать ее непосредственное участие в межмолекулярном последовательном переносе электрона в биологических и химических системах.

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И КОЛЕБАТЕЛЬНЫЙ СПЕКТР ХЛОРОФИЛЛА В ОСНОВНОМ И ПЕРВОМ ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИЯХ

Conformational analysis and vibrational spectra of chlorophyll (a) in the ground and first electronic states

Нечаев В.В.

Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77

Тел.: +7(929)773-85-45; e-mail: vl-nechaev@yandex.ru

Методы колебательной и вибронной спектроскопии широко используются для зондирования состояния хлорофилла в составе антенных комплексов и реакционных центров фотосинтеза. В последнее время было показано, что колебательные состояния хромофоров реакционного центра играют существенную роль в когерентном переносе энергии электронного возбуждения.

Целью работы была полная интерпретация колебательного спектра хлорофилла (a) в основном и первом электронном состоянии, а также определения барьеров внутреннего вращения всех заместителей макроцикла методом функционала плотности в приближении b3lyp/6-31G(d). Квантово химические расчеты были проведены по программе Gaussian, выполнена оптимизация равновесной геометрической структуры и вычислены частоты и интенсивности переходов для 248 фундаментальных колебаний метилхлорофиллида (a). На основе принципа локальной симметрии удалось проклассифицировать все колебания заместителей и макроцикла. Найдены барьеры внутреннего вращения заместителей за исключением фитольного остатка в основном и первом электронно-возбужденном состоянии. Обсуждена природа сильного различия в экспериментальном спектре РКР мономерного хлорофилла и специальной пары при резонансном возбуждении в полосе поглощения первого электронно-возбужденного состояния. Высказана гипотеза о роли заместителей в структуре хлорофилла в составе реакционного центра фотосинтеза.

НЕФОТОХИМИЧЕСКОЕ ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В АНТЕННЫХ КОМПЛЕКСАХ ФСII ЗА СЧЕТ ДИССИПАЦИИ ЭНЕРГИИ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ**Non-photochemical quenching of fluorescence in the antenna complexes of PSII due to energy dissipation in the reaction centers*****Пащенко В.З.1, Горохов В.В.1, Гришанова Н.П.1, Максимов Е.Г.1, Мамедов М.Д.2***

1 – Биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, Москва, 119991, Россия
email: vz.paschenko@gmail.ru

2 – Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, Москва, 119992, Россия

Время жизни и квантовый выход флуоресценции комплексов ФСII зависят от эффективности фотохимического (PQ) и нефотохимического (NPQ) тушения. Фотохимическое тушение флуоресценции антенны ФСII осуществляется путем захвата возбуждений адаптированными к темноте [P680Q_a] состояниями РЦ. При длительном (минуты) непрерывном освещении помимо процессов NPQ, развивающихся непосредственно в антенном комплексе, возникает значительная стационарная концентрация РЦ в состоянии P680⁺, которые усиливают NPQ. При интенсивном импульсном возбуждении генерируются как заметное количество триплетных состояний каротиноидов в антенне, так и “закрытые” состояния РЦ [P680⁻Q_a⁺], которые также обеспечивают нефотохимическое тушение флуоресценции антенны. В частности, Г. Ренгер показал, что константа скорости тушения флуоресценции состоянием [P680⁻Q_a⁺] в 2 раза больше константы скорости тушения состоянием [P680Q_a]. К такому заключению он пришел при анализе изменения выхода флуоресценции обработанных гидроксиламином мембранных фрагментов ФСII после 10 нс возбуждения на временной шкале 100 нс – 10 с.

В данной работе мы в прямом эксперименте измерили константы скорости фотохимического k_{P680} и нефотохимического k_{P680^+} тушения флуоресценции мембранных фрагментов (BVY частицы) фотосистемы II, а также кислородвыделяющих коровых частиц ФСII и коровых частиц, лишенных кислородвыделяющего комплекса. В “темновом” состоянии РЦ измеряли кинетики затухания флуоресценции антенны при низкоинтенсивном возбуждении ($\lambda=532$ нм) и регистрации свечения с помощью электроннооптического преобразователя. Частота возбуждения образца составляла 1 Гц, в процессе измерения образец непрерывно перемешивали. Для создания “закрытого” [P680⁻Q_a⁺] состояния РЦ было использовано высокоинтенсивное импульсное ($\lambda=532$ нм) предвозбуждение образца (накачка), опережающее на 8 нс измерительный импульс света. В этих условиях под действием импульса накачки в РЦ формировалось состояние [P680⁻Q_a⁺], после чего кинетика флуоресценции антенны измерялась с помощью пробного слабого пикосекундного импульса света, подаваемого на образец через 8 нс после импульса накачки. Оказалось, что эффективность тушения флуоресценции антенны фотоактивным пигментом РЦ в окисленном (P680⁺) состоянии в ~1.5 раза выше, чем эффективность тушения нейтральным (P680) состоянием РЦ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 14-04-01536 и 15-29-01167.

РАЗЛИЧИЯ ИНДУКЦИОННЫХ КРИВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ЛИСТЬЯХ И СОЗРЕВАЮЩИХ ПЛОДАХ ЯБЛОНИ *MALUS DOMESTICA*

Differences in fluorescence induction curves for leaves and ripening fruits of apple tree *Malus domestica*

Пикуленко М.М.1, Булычев А.А.2, Кумахова Т.Х.3

1—Музей земледования МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.1

2— Биологический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

3—РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550, Москва, ул. Тимирязевская д.49

e-mail: pikulenkomarina@mai.ru

Плоды многих растений, таких как яблоня, томат, киви, авокадо содержат хлоропласты, которые определяют их зеленую окраску в ходе онтогенеза. Особенности фотохимических и темновых стадий фотосинтеза хлоропластов плодов, в сравнении с фотосинтезом листьев, исследуют, в основном, для оценки зрелости плодов и теплового воздействия в ходе хранения. Отсутствует ясность, способны ли зеленые части плодов к самостоятельной фиксации CO₂ или же они только потребляют ассимиляты, поступающие из донорных листьев. Мощный приток органических соединений в развивающиеся плоды может определять специфику их фотосинтеза. Вероятно также, что существуют особенности, связанные с предстоящим переходом фотосинтезирующих хлоропластов в хромопласты. Один из способов выявления особенностей фотосинтетического аппарата плодов в ходе развития и адаптации к внешним условиям состоит в сравнении индукционных кривых флуоресценции, измеряемых на листьях и срезах зеленых плодов.

В наших опытах использовали листья, а также созревающие зеленые плоды яблони *Malus domestica* размером от 2 до 4 см, срезанные утром в день исследований при температуре воздуха около 18°C. Измерения проводили с помощью флуориметра PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, Англия) на срезах наружных слоев плодов толщиной 2–4 мм, площадью около 1.5 см². Образцы листьев и плодов адаптировали к темноте в течение 5 мин, а затем освещали красным светом (максимум при 650 нм, интенсивность 1500 мкмоль/(м²с), длительность освещения 2 с).

Индукционные кривые флуоресценции листьев яблони включали три фазы нарастания (O-J-I-P) в соответствии с результатами, полученными на других растениях. Вместе с тем, по индукционным кривым флуоресценции срезы наружных частей плодов существенно отличались от листьев. Основное отличие состояло в том, что в индукционных кривых плодов при комнатной температуре наблюдался переход O-K-J, который отсутствовал в листьях. По данным литературы пик K обычно проявляется после тепловой обработки (40°C) листьев и сопряжен с понижением квантовой эффективности ФС2, что объясняют нарушением кислород-выделяющего комплекса и дисбалансом притока–оттока электронов на уровне ФС2. В наших опытах без тепловой обработки пик K достигался при 400 мкс; его появление не сопровождалось снижением квантового выхода переноса электронов в ФС2. Полученные значения параметра F_v/F_m в плодах яблони составили 0,708–0,886; т.е. были аналогичны показателям фотосинтетической активности листьев.

Одна из причин наблюдаемых различий может быть связана с изменением путей газообмена в процессе созревания плодов. В отличие от листьев, в которых газообмен с внешней средой происходит при участии устьиц, в созревающих плодах появление прочной кутикулы затрудняет функционирование устьиц. Особенности функционирования хлоропластов в ходе созревания плодов представляет интерес для дальнейших исследований.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СВЕТОВОЙ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**The efficiency of light energy conversion in microalgae cells*****Полищук А.В., Золотарёва Е.К.***

Институт ботаники им. М.Г.Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, 01004; Украина
Тел/факс + 380442723231; e.zolotareva@mail.ru

Благодаря относительно высокой фотосинтетической эффективности и отсутствию гетеротрофных тканей одноклеточные микроводоросли являются наиболее продуктивными автотрофными организмами, хотя эффективность их фотосинтеза значительно уступает теоретически возможной [1,2]. В значительной степени это связано с тем, что скорость захвата фотонов при насыщающих интенсивностях света на несколько порядков превосходит скорость линейного переноса электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи, вследствие чего большая доля поглощенной энергии света рассеивается в форме тепла и ходе процессов, связанных с нефотохимическим тушением флуоресценции (NPQ). Доказано, что тепловая диссипация энергии и NPQ защищают фотосинтетический аппарат от фотоингибирования. В условиях естественной флуктуации освещенности адаптация к низким интенсивностям света обеспечивается за счет увеличения светособирающей антенны, размер которой становится избыточным при культивировании монокультуры в контролируемом режиме. Разрабатывая подходы к увеличению эффективности фотосинтетической трансформации энергии, Мелис [2] предложил гипотезу усеченной светособирающей антенны (*tla*), согласно которой уменьшение размера антенны способствует повышению фотосинтетической эффективности. К настоящему времени созданы генетические *tla* – конструкции, эффективность преобразования энергии в которых значительно превосходила показатели дикого типа. Целью настоящей работы была оценка факторов, влияющих на фотосинтетическую эффективность одноклеточных водорослей *Euglena gracilis* и *Chlorella vulgaris*.

Среди природных микроводорослей можно выделить виды, имеющие маленькую светособирающую антенну. Так небольшой размер светособирающей антенны характерен для эукариотической жгутиковой микроводоросли *Euglena gracilis*. В клетках *E. gracilis*, сформировавшихся в условиях автотрофного культивирования, соотношение Хл а/б составляет 9,8 – 10,2, что в 2,5 – 3 раза превосходит этот показатель у высших растений и одноклеточных зеленых водорослей. *E. gracilis* относится к светолюбивым организмам, способна расти как за счет фотосинтеза с использованием CO₂ в качестве единственного источника углерода, так и за счет ассимиляции экзогенных органических субстратов.

E. gracilis var. *Vacillaris* и *Chlorella vulgaris* культивировали автотрофно в течение 6 суток на жидкой минеральной среде при интенсивности освещения 150 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и температуре 27 °С. Скорость фотосинтетического выделения кислорода оценивали с помощью электрода Кларка. Флуоресценцию Хл а регистрировали ХЕ-РАМ флуориметром (Walz, Германия). Показано, что при переходе от автотрофного к миксотрофному типу питания изменяется содержание Хл, соотношение Хл а/б, и другие характеристики фотосинтетического аппарата *E. gracilis*. При этом в миксотрофных культурах не отмечалось признаков фотоингибирования при освещении 2500 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹. Размер светособирающей антенны и содержание хлорофилла у *Chlorella vulgaris* менялся в зависимости от температуры выращивания. Так при переносе в среду с 25-27 °С у клеток, выращенных при 5-10 °С, устойчивость к фотоингибированию и фотосинтетическая эффективность возрастали.

1. Ort, D.R., Zhu, X., and Melis, A., Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency, *Plant Physiol.*, 2011, 155, pp. 79-85.
2. Melis, A., *Plant Science*, 2009, 177, pp. 272-280.

КОРОТКОЖИВУЩИЕ ПАРАМАГНИТНЫЕ СОСТОЯНИЯ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ НА ПЕРВИЧНЫХ СТАДИЯХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ И ЭЛЕКТРОНА

Short-lived paramagnetic states generated on the primary stages of photosynthetic energy and electron transfer

Проскуряков И.И., Клемина И.Б., Ашихмин А.А., Махнева З.К., Москаленко А.А.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 2

Тел. +7(496)773-28-80; факс +7(496)733-05-32; e-mail: pros@issp.serpukhov.su

Парамагнитные состояния возникают в процессе фотосинтеза уже в течение первых пикосекунд после поглощения света. Практически все эти состояния являются короткоживущими, и исчезают за времена от пико- до миллисекунд. Состояния с временами жизни, превышающими десятки наносекунд, можно исследовать методами электронного парамагнитного резонанса. Наиболее высокое временное разрешение достигается с помощью метода ЭПР прямого широкополосного детектирования сигнала (ВР ЭПР), работающего без модуляции магнитного поля [1]. Разработанный в ИФПБ РАН спектрометр ВР ЭПР имеет временное разрешение $\sim 0,15$ мкс и позволяет проводить измерения при селективном возбуждении образцов в диапазоне длин волн 420 – 1500 нм.

Спектры ВР ЭПР, измеряемые, как правило, еще до протекания спин-решеточной релаксации, дают информацию как о природе парамагнитной молекулы, так и о механизмах генерации наблюдаемого состояния. В докладе будут приведены данные об ЭПР свойствах таких короткоживущих состояний, как радикальные пары, возникающие при освещении в реакционных центрах фотосинтеза, и триплетные состояния как РЦ, так и светособирающих пигмент-белковых комплексов. Основное внимание будет уделено результатам изучения процесса синглет-триплетного деления возбуждения в системах, содержащих каротиноиды. Этот процесс в последние годы вызывает значительный интерес, поскольку есть высокая вероятность его использования для повышения эффективности работы преобразователей солнечной энергии [2]. Процесс деления возбуждения обнаружен в изолированных комплексах периферийных светособирающих комплексов LH2 ряда пурпурных фототрофных бактерий при возбуждении входящих в их состав каротиноидов. Используя препараты с измененным пигментным составом, мы показали, что деление синглетного возбуждения молекулы каротиноида приводит к образованию пары триплетных молекул этих пигментов при участии молекул бактериохлорофилла, обеспечивающих суперобменное взаимодействие каротиноидов. Деление возбуждения обнаружено также в препаратах изолированных каротиноидов – сухих пленках и микрокристаллах. В этих случаях нами впервые зарегистрированы сигналы ЭПР двутриплетных комплексов – промежуточной стадии синглет-триплетного деления возбуждения. Прямые измерения показали, что двутриплетные комплексы распадаются за времена порядка сотен наносекунд, что существенно меняет общепринятые представления о механизме деления возбуждения.

Авторы выражают благодарность РФ (грант 14-14-00535) за финансовую поддержку работы.

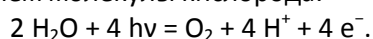
1. Клемина, И.Б. и Проскуряков, И.И., Электронный парамагнитный резонанс короткоживущих состояний, возникающих в процессе фотосинтеза, Гл. 4 в кн.: Современные проблемы фотосинтеза, т. 1, 2014. ISBN 978-5-4344-0181-4.
2. Smith, M.C. and Michl, J., Chemical Reviews, 2010, vol. 110, pp. 6891-6936.

ГИПОТЕЗА КОНКУРЕНТНОГО ОКИСЛЕНИЯ H₂O И H₂O₂ В РАСТИТЕЛЬНОМ ФОТОСИНТЕЗЕ**Hypothesis of competitive oxidation of H₂O and H₂O₂ in the plant photosynthesis**

Птицын Г.А., Илатовский В.А., Комиссаров Г.Г.

ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4
Тел. +7(495)939-7350; e-mail: gap2003@ya.ru

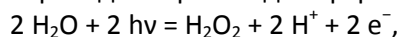
В 1941 году изотопными методами было установлено [1, 2], что кислород фотосинтеза выделяется из воды, а не из CO₂. В 70-ые годы было обнаружено [3], что при импульсном освещении фотосинтетический кислород выделяется циклически с периодом в четыре вспышки. Эту кинетику количественно описал Б. Кок с соавторами [4], которые предположили, что в кислород-выделяющем ферментном комплексе (КВК) растения происходит накопление черырёх окислительных эквивалентов в результате черырёх последовательных фотореакций (S₀ → S₁ → S₂ → S₃ → (S₄)). В результате, в КВК происходит окисление двух связанных молекул воды с выделением молекулы кислорода:



После этого КВК связывает две новые молекулы воды и цикл повторяется:

Кинетическая схема Кока получила широкое признание, однако в 1987 г. Мано и сотр. обнаружили [5], что кислород фотосинтеза обогащается по ¹⁸O₂ в присутствии меченного по кислороду пероксида водорода H₂¹⁸O₂. Отсюда следует, что источником кислорода фотосинтеза является пероксид водорода. Однако это не согласуется с четырехтактной кинетикой выделения кислорода, обнаруженной в [3, 4].

Разрешить это противоречие можно, предположив, что КВК окисляет (все-таки) воду, но процесс проходит через стадию формирования связанного H₂O₂:



(схемы окисления воды через пероксид не раз обсуждались ранее [6, 7]). Если H₂O₂ – естественный промежуточный продукт окисления воды, то КВК будет способен связать молекулу пероксида вместо воды в момент завершения очередного цикла окисления. Все, что для этого нужно, – наличие такой молекулы поблизости. Таким образом, в присутствии экзогенного пероксида КВК в каждом цикле будет окислять либо воду, либо пероксид на конкурентной основе. В отличие от воды, пероксид водорода, встраиваясь в КВК, образует не состояние S₀, как в случае с водой, а сразу S₂ с двумя накопленными окислительными эквивалентами, так что окисление до кислорода требует в этом случае лишь двух световых реакций. Теоретический анализ и компьютерные симуляции показывают, что в этом случае кинетика выделения кислорода при импульсном освещении будет похожа на коковскую [4] с периодом колебаний около черырёх вспышек. В то же время, часть кислорода фотосинтеза будет выделяться из пероксида водорода в соответствии с результатами [5].

Гипотеза конкурентного фотосинтетического окисления H₂O и H₂O₂ была подвергнута экспериментальной проверке (Птицын и др., 2015).

1. Виноградов, А.П. и Тейс Р.В., Докл. АН, СССР, 1941, т. 33, вып. 9, сс. 497-501.
2. Ruben, S., et al., J. Am. Chem. Soc., 1941, vol. 63, pp. 877-879.
3. Joliot, P., et al., Photochem. Photobiol., 1969, vol. 10, pp. 309-329.
4. Kok, B., et al., Photochem. Photobiol., 1970, vol. 11, pp. 457-475.
5. Mano, J., et al., Biochemistry, 1987, vol. 26, pp. 2495-2501.
6. Комиссаров, Г.Г., ЖФХ, 1973, т. 47, вып. 7, сс. 1633-1642.
7. Выхинский, Т.Ж., Фотосинтез, под ред. Говинджи, М.: Мир, 1987, т. 1, сс. 633-679.

ВЛИЯНИЕ H₂O₂ НА КИСЛОРОДНУЮ КИНЕТИКУ ФОТОСИНТЕЗА

Effects of H₂O₂ on oxygen kinetics of photosynthesis

Птицын Г.А., Илатовский В.А., Комиссаров Г.Г.

ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, 119991, Москва,

ул. Косыгина, 4 Тел. +7(495)939-7350;

e-mail: gap2003@ya.ru

Экспериментально изучали влияние экзогенного пероксида водорода на кинетику выделения кислорода клетками *Chlorella vulgaris* при импульсном освещении. При концентрации H₂O₂ 0.003 М кислородная кинетика была близка к контрольной, а при 0.3 М и выше измерения оказались невозможны из-за слишком большого уровня шумов разложения пероксида в электрохимической ячейке. Информативными оказались измерения при концентрации в области 0.03 М. Здесь экзогенный пероксид заметно меняет кинетику. Первый кислородный максимум острее чем в контроле и появляется на одну вспышку раньше. Период колебаний выхода кислорода остается близким к четырем вспышкам, но увеличивается их затухание. Обработку данных проводили с помощью оригинальных компьютерных программ в предположении конкурентного светозависимого связывания H₂O и H₂O₂ с кислород-выделяющим комплексом (КВК) в конце каждого цикла окисления. Расчеты показали, что при этой концентрации доля КВК, связывающихся с молекулой H₂O₂ достигает 25÷56% (в зависимости от трактовки одного из параметров счета). Это означает, что для хлореллы сродство КВК к пероксиду водорода превышает его сродство к воде (что и предполагалось при разработке схемы конкурентного связывания). При 7-минутной темновой адаптации водорослей в опыте и контроле происходит частичное восстановление пула КВК за счет взаимодействия с ограниченным пулом эндогенного восстановителя. Но в присутствии 0.03 М пероксида водорода темновое восстановление тормозится, и каждый КВК остается в среднем на 1.0 окислительный эквивалент (ОЭ) более окисленным чем в контроле. Расчет показывает, что около 0.3 ОЭ возникает в результате светозависимого связывания КВК с пероксидом в течение предшествующей темноте световой подготовки образца, а еще 0.7 ОЭ – за счет различий только в темновых реакциях. Если принять, что эти 0.7 ОЭ в КВК возникают в темноте благодаря медленной обратимой реакции замещения воды на пероксид:



то получаем, что около 35% всех КВК в темноте окисляются пероксидом. Интересно, что здесь получается величина того же порядка, что и вычисленная выше доля КВК, конкурентно связывающихся с пероксидом на свету (25÷56%). Исходя из этого можно предположить, что в присутствии 0.03 М пероксида водорода вычисленные вероятности связывания КВК с пероксидом и водой близки к термодинамически равновесными, т.е. в отсутствии света и эндогенного восстановителя имело бы место равновесие: $[S_2]/[S_0] = 0.35 \div 0.56$. Если принять эту гипотезу, то из закона действующих масс для реакции (1) легко оценить разность энергий связывания КВК с H₂O₂ и H₂O:

$$E(S_2 + 2 H_2O) - E(S_0 + H_2O_2) \approx T \ln([H_2O_2]/[H_2O]) \approx -0.19 \text{ эВ.}$$

Здесь $E(S_2 + 2 H_2O)$ – внутренняя энергия связанного с КВК пероксида и свободной воды, а $E(S_0 + H_2O_2)$ – внутренняя энергия связанной воды и свободного пероксида. Проведенное исследование говорит в пользу гипотезы конкурентного окисления H₂O₂ и H₂O в фотосинтезе, причем, по оценке, пероксид водорода связывается с КВК на 0.2 эВ сильнее, чем вода. Следует отметить, что при обработке кинетики необходимо учитывать наличие у хлореллы сверхвосстановленного состояния S₋₁, находящегося вне четырехтактного коковского цикла и заселяющегося только за счет темновых процессов.

1. Птицын, Г.А. и Комиссаров, Г.Г., Химическая физика, 1993, т. 12, вып. 11, сс. 1462-1475.

КАРБОНГИДРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АТФСИНТАЗНОГО КОМПЛЕКСА ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА**Carbonic anhydrase activity of ATPsynthase complex from spinach chloroplasts*****А.В. Семенухин, А.П. Хомочкин, Е.К. Золотарёва***

Институт ботаники им. М.Г.Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, 01004, Киев, ул. Терещенковская, 2; Украина

Тел/факс + 380442723231; *membrana@ukr.net*

Мембраносвязанный бикарбонат выполняет кофакторную роль в хлоропластах, стимулируя фотосинтетический электронный транспорт и фотофосфорилирование. Эффект бикарбоната может быть опосредован множественными формами тилакоидных карбонгидраз (КА), локализация которых определена лишь частично, а функциональная роль не установлена. Целью работы была идентификация карбонгидразной активности в интегральном полипептидном комплексе АТФ-синтазы. Тилакоиды выделяли из свежих листьев шпината и солюбилизировали при обработке неионными детергентами дигитонином или додецилмальтозидом. Переведенные в раствор полипептидные комплексы разделяли методом нативного электрофореза со смещением заряда. Положение зон геля, содержащих АТФсинтазний комплекс и его отделенную каталитическую часть (CF_1), определяли с помощью цветной реакция на АТФазную активность. Локализация АТФсинтазы и CF_1 в гелях подтверждали анализом субъединичного состава соответствующих белковых зон после ДДС-электрофореза во втором направлении. Гидролитическую активность мембраносвязанной АТФсинтазы активировали при освещении тилакоидов в присутствии ДТТ. Скорость гидролиза АТФ определяли пируваткиназным методом по снижению концентрации НАДН, пропорциональному в присутствии лактатдегидрогеназы количеству образовавшегося АДФ.

С помощью индикатора бромтимолового синего показано, что полипептидные зоны неденатурированного геля, соответствующие АТФ-синтазному комплексу, проявляют карбонгидразную активность. Возможную функциональную роль обнаруженной карбонгидразы тестировали, исследуя влияние специфических сульфаниламидных ингибиторов на скорость свето-индуцированного гидролиза АТФ в суспензии изолированных тилакоидов. Установлено, что при концентрациях от 0,25 до 1 мМ этоксизоламид и ацетозаламид ингибировали эту реакцию. Полученные результаты согласуются с предположением о том, что в составе АТФсинтазы тилакоидных мембран присутствует компонент, способный катализировать интерконверсию форм угольной кислоты, связанную с протонным обменом.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ПРОТОНИРОВАНИЯ ВТОРИЧНОГО ХИНОНА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ РЕАКЦИОННОМ ЦЕНТРЕ БАКТЕРИИ *Rb. SPHAEROIDES*

Modeling of protonation mechanism of the secondary quinone in the bacterial photosynthetic reaction center of the *Rb. Sphaeroides*

М.Л. Степанов, П.М. Красильников, А.Б. Рубин

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12.

E-mail: mishc9@gmail.com

В работе исследована конформационная динамика водородных связей в локальном окружении молекулы вторичного хинона Q_B фотосинтетического реакционного центра (РЦ) бактерии *Rb. sphaeroides*. Показано, что водородные связи, образуемые вторичным хиноном с аминокислотными остатками, обуславливают как стабилизацию восстановленного состояния, так и протонирование молекулы Q_B .

В нативных РЦ после световой активации первичного электронного донора – димера бактериохлорофилла (*P*) через 200 пс происходит восстановление первичного хинона Q_A^- , а затем примерно через 200 пкс электрон с первичного хинона переходит на вторичный хинонный акцептор, формируя анионное состояние Q_B^- вторичного хинона. После восстановления фотоокисленного димера цитохромным комплексом, процесс повторяется, и вторичный хинон переходит в состояние Q_B^{2-} , которое образуется в результате реакции $Q_A^-Q_B^- \rightarrow Q_AQ_B^{2-}$. Дважды восстановленный хинон Q_B^{2-} покидает РЦ в нейтральной форме Q_BH_2 , которая образуется в результате двукратного протонирования молекулярного иона Q_B^{2-} [1]. Спектроскопические методы не позволяют однозначно определить последовательность процессов восстановления и протонирования вторичного хинона. В частности, не детектируются промежуточных форм хинонов Q_A и Q_B между состояниями $Q_A^-Q_B^-$ и $Q_AQ_BH^-$. На сегодняшний день предполагаются три основных пути протекания этих процессов: через промежуточное состояние $Q_aQ_b^{2-}$, через состояние $Q_a^-Q_bH^*$ или посредством одновременного переноса первого протона второго электрона на вторичный хинон [2].

Методами вычислительной квантовой химии были рассчитаны значения энергетических параметров модельной системы и определены энергетически наиболее выгодные сценарии. За основу была взята оптимизированная структура РЦ 1AIJ из базы данных www.rcsb.org. Квантово-химическая модель включала молекулу вторичного хинона с редуцированным «хвостом», аминокислотные остатки Ser L223 и Asp L213. Остаток Ser L223 протонирует хинон, а остаток Asp L213, обладая меньшим значением pK_a , возмещает потерю протона Ser L223 [1, 3]. Внешнее поле белкового окружения и кофакторов задавалось при помощи метода EFRAG. Для расчета использовалась программа FIREFLY.

Были получены следующие результаты. В состоянии $Q_A^-Q_B^-$ есть дополнительный локальный минимум потенциальной энергии, соответствующий конформации модельной системы, когда Q_B^- протонирован, то есть восстановление вторичного хинона идет через промежуточную стадию $Q_AQ_BH^*$. Было показано, что протонирование Q_B^- происходит по кооперативному механизму, когда происходит одновременный перенос протона с Ser L223 на Q_B^- и с Asp L213 на Ser L223. Для стабилизации этого состояния системы необходим перенос второго электрона с Q_A на Q_B .

1. Wright, C., *Frontiers in Bioscience*, 2004, vol. 9, pp. 309-337.
2. Okamura, M. Y. and Feher, G., *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 6, pp. 861-896.
3. Krammer, E.-M., Till, M.S., Sebban, P., and Ullmann, G.M., *J. Mol. Biol.*, 2009, vol. 388, no 3, pp. 631-643.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ ГЛИКОЛИЗА И ДЫХАНИЯ НА [АТФ] В ЦИТОЗОЛЕ И МИТОХОНДРИЯХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АТФ-СЕНСОРА**Fluorescence microscopy study of inhibition of glycolysis and respiration on [ATP] in the cytosol and mitochondria of cultured neurons****Сурин А.М.1,2,3, Горбачева Л.Р.3, Савинкова И.Г.3, Пинелис В.Г.2**

1 – ФГБНУ Научный центр здоровья детей МЗ РФ, 119991 Москва, Ломоносовский пр-кт, 2

2 – ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

3 – ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

e-mail: surin_am@mail.ru

Измерения поглощения кислорода мозгом млекопитающих и количества производимого в этом органе АТФ показывают, что в мозге 90-95% АТФ синтезируется за счет окислительного фосфорилирования (ОксФос). В работе представлены результаты изменения [АТФ] в индивидуальных гиппокампальных нейронах в культуре с помощью белкового флуоресцентного АТФ-сенсора в цитозоле и сенсора, имеющего адресную пептидную последовательность доставки в митохондрии. Ингибирование гликолиза заменой глюкозы на не метаболизируемый аналог 2-дезоксиглюкозу (2DG, 5мМ, 5-20мин) не вызвала снижения [АТФ] в цитозоле ([АТФ]с), хотя блокада гликолиза не только останавливает производство АТФ в цитозоле, но и прекращает производство пирувата, который считается основным субстратом, обеспечивающим работу цикла трикарбоновых кислот. Обратимая блокада дыхания ингибированием комплекса IV цианидом (NaCN, 1 мМ), также не оказала заметного влияния на [АТФ]с, несмотря на то, что блокада дыхательной цепи влечет за собой реверсию АТФсинтазы в АТФазу и, соответственно, потребление митохондриями цитозольного АТФ. Сильное падение [АТФ]с происходило только при сочетанном действии ингибиторов гликолиза и дыхания (2DG +NaCN). В матриксе митохондрий, в отличие от цитозоля, как ингибирование гликолиза, так и блокада дыхания цианидом вызывали быстрое падение [АТФ] ([АТФ]м). Подобное по амплитуде и скорости снижение [АТФ]м отмечено при ингибировании ОксФос олигомицином (Oligo, 2,5мкг/мл). При одновременном действии 2DG и NaCN происходило небольшое дополнительное снижение [АТФ]м. Полученные данные показывают, что покоящиеся нейроны при ингибировании по отдельности гликолиза или окислительного фосфорилирования способны компенсировать каждый из утерянных источников АТФ, поддерживая постоянство [АТФ]с. Сопоставление результатов данной работы с измерениями NADH автофлуоресценции нейронов (Сурин и соавт, 2010; Khodorov et al, 2012) позволяют предположить, что при недостатке глюкозы митохондрии нейронов используют вместо пирувата глутамат, концентрация которого в цитозоле может достигать 10мМ (Nicholls, 2009), вовлекая его в глутамат-глутаминовый цикл (цикл Робертса, шунт гамма-аминомасляной кислоты).

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ АТФ В ЛИСТЕ ГОРОХА ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА

Analysis of ATP content changes in pea leaves after induction of variation potential

Сурова Л.М., Шерстнева О.Н., Гаспирович В.В., Бушуева А.В., Сухов В.С.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр-т. Гагарина, 23 Тел.: +7(831) 462-32-13; e-mail: lyubovsurova@mail.ru

Электрические сигналы, в частности переменный потенциал (ВП), вызывают изменения в протекании многих физиологических процессов, включая инактивацию темновой стадии фотосинтеза и активацию дыхания, эти процессы могут увеличивать содержание АТФ в листьях. С другой стороны, именно повышение концентрации АТФ в растительном организме может быть одним из механизмов возрастания его устойчивости к действию стрессоров. Таким образом вопрос об увеличении содержания АТФ под действием ВП является одним из ключевых для понимания функциональной роли электрических сигналов.

Исследования проводили на двух-, трёхнедельных проростках гороха *Pisum sativum* L. Регистрацию электрических сигналов осуществляли с использованием хлорсеребряных макроэлектродов и высокоомного милливольтметра ИПЛ-113 с выходом на ПК. Через определённое время после распространения электрического сигнала, лист использовали для определения АТФ. Методика включала в себя гомогенизацию листа в 5% растворе ледяной трихлоруксусной кислоты, её нейтрализацию, разведение пробы и определение АТФ люциферин-люциферазным методом, с использованием стандартного набора (ATP determination kit, BIAFFIN GmbH & Co KG, Германия). Хемилюминисценция при этом определялась с использованием многофункционального фотометра-хемилюминометра для микропланшет Synergy 2 (BioTek instruments, США).

Локальный ожог вызывал распространение ВП во второй лист растения, при этом в четвертом листе наблюдалась лишь незначительная реакция. В условиях освещения при генерации ВП во втором листе наблюдалось снижение активности фотосинтеза (снижение ассимиляции CO₂ и квантовых выходов фотосистем). Эта инактивация имела двухфазный характер: быстрая фаза развивалась через 5 минут, медленная – через 40 минут после ожога. Во втором листе через 5 минут после ожога наблюдалось возрастание содержания АТФ по сравнению с контролем, достигающее максимума через 10 минут после ожога, достоверно превышающее контрольный уровень. К 40-й минуте развивался второй максимум содержания АТФ. В четвертом листе изменений активности фотосинтеза при ожоге не наблюдалось. Анализ влияния ВП на содержание АТФ в четвертом зрелом листе гороха показал отсутствие достоверных различий с контролем. Можно заключить, что именно ВП является основным механизмом, сопрягающим локальный ожог листа и повышение содержания АТФ в неповрежденных частях растения. Для выявления возможной роли фотосинтеза в индуцированном локальным ожогом возрастании содержания АТФ во втором листе, был исследован ответ в условиях затемнения. Было показано, что локальный ожог вызывал увеличение содержания АТФ, которое имело один максимум через 5 минут после нанесения повреждения. Таким образом, было показано, что ВП может вызывать повышение содержания АТФ в неповрежденных листьях. Такое изменение содержания АТФ при локальном ожоге, связано, по-видимому, с ответами фотосинтеза и дыхания.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-01899 А и грантом Российского научного фонда №14-26-00098.

ВАРИАБЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ В ХОДЕ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**Variation potential as mechanism of regulation of energy conversion during photosynthesis and respiration in higher plants**

Сухов В.С., Плотникова Ю.И., Новикова Е.М., Воденев В.А.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр-т. Гагарина, 23

Тел.: +7(831) 462-32-13; e-mail: vssuh@mail.ru

Успешное существование растений в меняющихся условиях окружающей среды требует наличия регуляторных систем, контролирующей активность процессов дыхания и фотосинтеза в зависимости от действия на растительный организм различных внешних факторов. При этом известно, что при локальном действии повреждающих факторов быстро развивающиеся изменения фотосинтеза и дыхания могут наблюдаться в неповрежденных участках высшего растения. По-видимому, сигналом, связывающим поврежденный и неповрежденные участки, является уникальная электрическая реакция высших растений – варибельный потенциал (ВП). ВП представляет собой местный электрический ответ, который вызван распространением сигнала гидравлической и (или) химической природы и связан с обратимой инактивацией протонной АТФазы плазматической мембраны. В настоящее время показано, что ВП вызывает снижение активности фотосинтетических процессов, которое может включать в себя быструю (менее 15 мин) и длительную (десяtkи минут – часы) компоненты. Основным механизмом развития фотосинтетического ответа является, по-видимому, снижение активности темновой стадии фотосинтеза, которая может быть обусловлена как инактивацией ферментов цикла Кальвина, так и уменьшением поступления CO₂ в клетки и хлоропласты. Последнее может быть связано как со снижением соотношения CO₂/HCO₃⁻, так и с возможным изменением активности аквапоринов, которые также участвуют в транспорте углекислого газа. В то же время, ВП может непосредственно инактивировать процессы в электронно-транспортной цепи хлоропластов, что, вероятно, связано с ростом нефотохимического тушения флуоресценции и изменениями в локализации ферредоксин-НАДФ-редуктазы. Помимо влияния на фотосинтетические процессы, ВП может вызывать кратковременную активацию дыхания, которая продолжается в течение приблизительно 10 мин после индукции электрического сигнала и, по-видимому, отвечает за 30-40% от общей величины быстрых изменений газообмена на свету. Механизм влияния ВП на фотосинтез и дыхание высших растений, по-видимому, связан с обратимой инактивацией протонной АТФазы плазматической мембраны и связанными с нею изменениями внутри- и внеклеточного pH. В дальнейшем, ответы фотосинтеза и дыхания приводят к повышению содержания АТФ в растении, что, вероятно, является одним из механизмов возрастания устойчивости фотосинтетического аппарата и растения в целом к неблагоприятным факторам, которое наблюдается после генерации и распространения ВП.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект №14-26-00098).

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТАРНЫХ ПУТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЕ НА ОСНОВЕ СТОХАСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

The analysis of oxygen reduction elementary modes in cytochrome c oxidase based on stochastic modeling

Тимова В.Ю.(1), Ransac S.(2), Бороновский С.Е.(1), Нарциссов Я.Р.(1), Mazat J.P.(2)

1 – НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, ул. 6-ая Радиальная, д.24, стр.14

2 – Universite Bordeaux 2, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux-cedex, France

Тел./факс: +7(495)327-49-87; e-mail: scihazard@yandex.ru

Ключевым элементом цитохром с-оксидазы является бинуклеарный центр, в котором происходит четырёхэлектронное восстановление кислорода с образованием воды. В отличие от классической реакции в данном процессе участвуют несколько редокс-центров, и последовательность переходов электронов между ними не является детерминированной. Таким образом, предсказание путей переноса и их количественная оценка необходимы для моделирования работы комплекса в целом. Каждый этап восстановления кислорода в каталитическом центре фермента представляет собой совокупность процессов транслокации протонов и переноса электрона между редокс-центрами цитохром с-оксидазы, протекающих с очень высокими скоростями, делающими недоступным их изучение с помощью спектрофотометров с временным разрешением. В данной работе представлен анализ элементарных путей восстановления кислорода на основе стохастической модели. Схема, описывающая перераспределение электронов, включала в себя двенадцать возможных состояний бинуклеарного центра. Константы туннелирования электронов, необходимые для количественной оценки вероятности переходов, были рассчитаны на основании кристаллографических данных о расстоянии между редокс-центрами и их потенциалов. В силу того, что лимитирующим фактором в каталитическом цикле цитохром с-оксидазы является присоединение кислорода, для получения распределения элементарных мод стадии его связывания и переноса в активный центр были исключены из рассмотрения. Полученное таким образом среднее время единичной моды восстановления составляет 2.8 мкс. Показано, что наиболее медленной стадией восстановления кислорода является первичное окисление меди и гемового железа бинуклеарного центра. Несмотря на это, элементарные моды, включающие в себя депротонирование тирозина на начальном этапе, реализуются с частотой, не превышающей десяти процентов.

ВЛИЯНИЕ АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ НА ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОСИНТЕЗА В КУЛЬТУРЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA SP.***Nitrate starvation effect on the primary photosynthetic processes in *Chlorella sp.* microalgae culture*****Фролов А.Е., Хрущев С.С., Плюснина Т.Ю., Конюхов И.В., Погосян С.И., Ризниченко Г.Ю.***

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12
+7(495)9398902, styx@biophys.msu.ru

В представленной работе исследовано изменение кривых индукции флуоресценции хлорофилла *a* в процессе роста культуры микроводорослей *Chlorella sp.* Анализ экспериментальных кривых индукции флуоресценции широко используются для оценки активности фотосинтетического аппарата и влияния на него внешних факторов. Начальный участок кривой индукции флуоресценции, построенной в логарифмическом масштабе по времени, как правило, представляет собой трехфазную кривую. Интенсивность флуоресценции возрастает от исходного уровня F_0 (после темновой адаптации) до максимального уровня F_M (при насыщающей интенсивности света). Фазы нарастания кривой OJ, JI и IP при интенсивности возбуждающего света порядка нескольких тысяч мкЭ/м²/с приходятся на 0–2.5 мс, 0.3–20 мс и 20–300 мс, соответственно, и отражают разные стадии лимитирования фотосинтетического потока электронов. В данной работе предполагается, что на протяжении фазы OJ поток электронов лимитируется скоростью восстановления первичного хинона Q_A , на стадии JI – скоростью обмена вторичного хинона Q_B с пулом пластохинонов, а на стадии IP – скоростью окисления пластохинона цитохромным b_6f комплексом. Максимальный уровень флуоресценции F_M соответствует полному восстановлению Q_A . По характеру фаз кривой можно судить, насколько эффективен электронный транспорт в начальных стадиях процессов фотосинтеза.

Выращивание микроводорослей проводили на среде Тамия 1:20 и 1:30 в фотобиореакторе. По мере роста культуры происходило истощение среды, что после 25 часов приводило к возникновению условий азотного голодания. Измерение кривых индукции флуоресценции проводилось автоматически каждые два часа. Математическую обработку результатов измерений проводили с помощью разработанного нами метода мультиэкспоненциальной аппроксимации [1]. Получены зависимости характерных времен и амплитуд отдельных фаз нарастания флуоресценции от времени роста культуры. Показано, что характерное время фазы OJ уменьшается в процессе роста культуры, что может быть вызвано увеличением эффективного сечения поглощения реакционных центров ФС2. Фаза JI не выражена на начальных стадиях роста культуры и имеет максимальную амплитуду на ранних стадиях азотного голодания. У клеток, изначально находившихся в бедной среде (Тамия 1:30), данная фаза проявляется раньше (27 час), чем у клеток, помещенных в богатую среду (Тамия 1:20, 29 час). Мы предполагаем, что это связано с уменьшением относительного количества реакционных центров ФС2 при голодании, в результате чего, с одной стороны, увеличивается их эффективное сечение поглощения, а с другой стороны – увеличивается относительный размер пула пластохинонов. Появление и исчезновение фазы JI может определяться также перераспределением лабильных светособирающих комплексов между фотосистемами 1 и 2 и увеличением доли Q_B -невосстанавливающих реакционных центров. По-видимому, с этим же связано и увеличение характерного времени фазы IP.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-00326-а.

1. Плюснина, Т.Ю., и др., Биофизика, 2015, т. 60, №3, сс. 487-49.

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ ВОДОРОДА В ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ПРИ ПОМОЩИ ГИДРОГЕНАЗНОГО ЭЛЕКТРОДА

Transformation of chemical energy of hydrogen in electricity by hydrogenase electrode

Шастик Е.С., Зорин Н.А., Цыганков А. А.

Институт Фундаментальных Проблем Биологии РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская д.2,

Тел. 8(4967)732791 e-mail: shastikevgeny@gmail.com

К наиболее важным проблемам, стоящим перед современной цивилизацией, можно отнести дефицит энергоносителей и утилизацию техногенных отходов, загрязняющих окружающую среду. Эти проблемы являются взаимосвязанными, так как большая часть современной энергетики использует полезные ископаемые: нефть, газ, каменный уголь. При использовании ископаемого топлива в атмосферу выделяются продукты, загрязняющие ее. Очистка органических отходов, в свою очередь, требует больших затрат электроэнергии, хотя окисление этих же отходов могло бы давать энергию. Таким образом, использование отходов как вторичных ресурсов для получения энергии - перспективный путь решения проблем энергосбережения и утилизации мусора. Особенно интересен с этих позиций молекулярный водород, синтезируемый биологическим путем из сточных вод.

Преобразование биоводорода в электричество является важной практической задачей. При этом использование H_2 в топливных элементах (ТЭ) в децентрализованных энергосистемах, где H_2 образуется из органических отходов на месте их получения, может решить проблемы его хранения и транспортировки без изменения инфраструктуры энергосетей. Однако для использования биоводорода в ТЭ на основе платины требуется его предварительная очистка от каталитических ядов, таких как H_2S , необратимо инактивирующих металлический катализатор. С другой стороны совмещение в одном пространстве ТЭ и биореактора, генерирующего водород, может дать дополнительные преимущества. Например, снижение парциального давления водорода в биореакторе, за счет его поглощения ТЭ, может увеличить скорость выделения H_2 . Как альтернативу катализу благородными металлами предлагается использовать биологические катализаторы — ферменты, такие как гидрогеназа. Гидрогеназа – белок, участвующий в превращениях водорода в живых организмах.

Целью данной работы является изучение некоторых особенностей работы гидрогеназных электродов (ГЭ). При изучении активности ГЭ в диапазоне температур нами показано, что энергия активации электрокатализа существенно зависела от перенапряжения на электроде, снижаясь при повышении перенапряжения. При этом энергия активации электрокатализа численно совпадала с энергией активации гидрогеназы лишь при 50 мВ, становясь больше при пониженных и значительно меньше при повышенных перенапряжениях. Этот факт свидетельствует в пользу того, что лимитирующая стадия биоэлектрокатализа неодинакова при разных перенапряжениях, причем ферментативная активность гидрогеназы и ее количество не являлись лимитирующими факторами. Также нами показано, что в биореакторе с хемогетеротрофным консорциумом, разлагающим крахмал, ГЭ работоспособен, как в режиме сенсора водорода, так и в режиме электрокаталитической генерации тока. После 220 часов работы его активность снижалась не более чем на 20%. При этом электрод потреблял до 18,7% от всего выделенного культуры H_2 .

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИНАМИКА ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В ФОТОСИСТЕМЕ 1 ЦИАНОБАКТЕРИИ SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803**Femtosecond Dynamics of Electron Transfer in Photosystem I Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803*****Шелаев И.В.1, Гулин А.А.1, Гостев Ф.Е.1, Надточенко В.А.1, Семенов А.Ю.2, Мамедов М.Д.2, Шувалов В.А.3***

1-ИХФ РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

2-ИФХБ МГУ, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 40

3-ИФПБ РАН, 142290, г. Пущино, Московская обл.

Тел.: +7(495)939-73-47; e-mail: shelaev@bk.ru

В последнее время процесс перенос электрона в фотосинтетическом комплексе фотосистема 1 (ФС1) изучается самым активным образом различными спектроскопическими методами, включая такой метод, как фемтосекундная абсорбционная спектроскопия. Однако, ранние стадии процесса переноса электрона в реакционном центре (РЦ) ФС1 крайне сложно выделить от мощного сигнала возбужденного антенного комплекса, который имеет место на тех же временах. Тем не менее, была разработана методика, позволившая выделить процессы, протекающие в реакционном центре, и получить кинетические кривые и спектры в чистом виде для промежуточных ион-радикальных пар.

Фемтосекундные эксперименты были выполнены на установке, собранной в Лаборатории био- и нанофотоники в ИХФ РАН. Процессы разделения зарядов в фотосистеме 1 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 исследовались с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии методом «возбуждение-зондирование». Возбуждение осуществлялось импульсом длительностью 20 фс и несущей длиной волны 720 нм. Таким импульсом преимущественно возбуждался первичный донор электрона – димер P700, находящийся в реакционном центре. Это позволило наблюдать спектральные особенности, относящиеся к процессам первичного разделения заряда на самых ранних временах.

Было показано, что в условиях нашего эксперимента процесс переноса электрона в реакционном центре (РЦ) ФС1 происходит за времена менее 100 фс, передача энергии возбуждения от антенны Chl^* к $P700A_0A_1$ в ФС1 за время ~ 5 пс и образование второй ион-радикальной пары $P700^+A_0A_1^-$ за ~ 25 пс.

В ходе исследований мутантных штаммов ФС1 было установлено, что точечная мутация аксиального лиганда к хлорофиллу A_0 в ветви А цепи переноса электрона ФС1 приводит к большему замедлению процессов в РЦ, чем аналогичная мутация в ветви В, что указывает на их неэквивалентность.

Работа поддержана грантом Президента РФ № МК-6515.2015.4.

НОВЫЕ ДАННЫЕ О МЕХАНИЗМАХ ТРАНСФОРМАЦИИ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ.

New facts on the mechanisms of myosin phenotype transformation during unloading

Шенкман Б.С., Ломоносова Ю.Н., Вильчинская Н.А., Птицын К.Г.

ГНЦ РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

Введение. В условиях мышечной разгрузки различной природы обычно наблюдается снижение экспрессии ТЦМ (тяжелых цепей миозина) медленного типа и иногда типа IIA, и повышение экспрессии изоформ ТЦМ I1b и I1d/x. В ряде исследований особое внимание обращается на работу сигнального пути кальцинейрин/NFATc1. Путем дефосфорилирования NFATc1 и его миграции в миоядра этот механизм способствует повышению экспрессии ТЦМ медленного типа. Вместе с тем было показано, что количество миоядер, содержащих NFAT снижается в *m. soleus* и *m. vastus lateralis* человека при гипокинезии [Salanova et al., 2011]. Мы предположили, что существует механизм стабилизации быстрого фенотипа, который реализуется путем супрессии кальцинейринового пути. Поэтому анализ состояния кальсарцинов I и II (KC1 и KCII), эндогенных ингибиторов фосфатазной активности кальцинейрина представляет для нас существенный интерес. В то же время известно, что миоядерный GSK3 β способствует экспорту NFATc1 из ядра, а фосфорилирование этой молекулы предотвращает этот экспорт. **Цель работы** Изучение состояния миоядерных ингибиторов NFATc1 на ранних этапах гравитационной разгрузки. **Материал и методы** Крысы Wistar, самцы были подвергнуты антиортостатическому вывешиванию в течение 3, 7 и 14 суток. Содержание мРНК KC-II и медленной изоформы ТЦМ определяли методом qRT PCR. MuRF-1 и MuRF-2 определяли в цитоплазматической и ядерной фракциях мышечной ткани методом вестерн-блоттинга (WB), а также в ядрах с помощью иммуноцитохимической технологии. Фосфорилированную форму GSK3 β определяли в ядерной фракции методом WB. **Результаты и обсуждение.** Мы обнаружили, что после трех суток вывешивания содержание мРНК KCII увеличилось вдвое в камбаловидной мышце крысы по сравнению с виварным контролем. Этот уровень поддерживался и после 7 суток воздействия, а после 2 недель возрос более чем до пятикратных значений. Увеличение экспрессии кальсарцина-II (в волокнах II быстрого типа) может быть одним из компонентов механизма стабилизации быстрого фенотипа в быстрых волокнах, но, что более важно, во вновь трансформированных быстрых волокнах. Мы также обнаружили, что с 3-х до 14-х суток вывешивания содержание MuRF-1 и MuRF-2 в ядерной фракции камбаловидной мышцы возрастало в 4-5 раз по сравнению с контрольным уровнем. Эти данные, полученные методом электрофореза с последующим WB ядерной фракции камбаловидной мышцы крысы были затем подтверждены в исследовании колокализации антител против MuRF-1 и MuRF-2 с ядерным красителем DAPI на поперечных срезах *m. soleus*. Мы предполагаем, что импорт изоформ MuRF в ядра способствует экспрессии KCII во время разгрузки. Мы также наблюдали снижение содержания фосфорилированной GSK3 β в ядерной фракции *m. soleus*. Итак, снижение экспрессии медленной изоформы ТЦМ, характерное для разгрузки, сопровождается увеличенной экспрессией факторов, предотвращающих накопление NFATc1 в миоядрах. Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда 15-14-00358

РОЛЬ ИНАКТИВАЦИИ H^+ -АТФАЗЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В РАЗВИТИИ ВЫЗВАННЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ИЗМЕНЕНИЙ ФОТОСИНТЕЗА**Role of plasma membrane H^+ -ATPase inactivation in VP-induced photosynthetic changes**

Шерстнева О.Н., Сурова Л.М., Морозова Е.Н., Мысягин С.А., Сухов В.С.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603950, Нижний Новгород, пр-т. Гагарина, 23

Тел.: +7(831) 462-32-13; e-mail: sherstneva-oksana@yandex.ru

В ответ на повреждающее воздействие генерируется вариабельный потенциал (ВП), который вызывает функциональные изменения у высших растений, включая фотосинтетический ответ. Известно, что ВП может вызывать кратковременное подавление фотосинтеза; однако, механизм влияния ВП на процессы фотосинтеза остаётся дискуссионным. Целью данного исследования был анализ влияния ВП на фотосинтез гороха и участия H^+ -АТФазы в этом процессе.

Было показано, что ВП, вызванный ожогом, вызывал снижение уровня ассимиляции CO_2 и квантовых выходов фотосистем I и II, а также рост нефотохимического тушения у проростков гороха. Ратиометрический анализ изменений рН с использованием рН-чувствительных флуоресцентных зондов показал, что генерацию ВП сопровождает увеличение рН апопласта и снижение рН цитоплазмы, что говорит о вероятной инактивации H^+ -АТФазы плазматической мембраны. Для анализа влияния ингибирования и активации H^+ -АТФазы на вызванный ВП фотосинтетический ответ листа гороха производилась предобработка листа ортованадатом натрия и фузикокином, соответственно. Обработка ортованадатом снижала амплитуду ВП и значительно уменьшала величину фотосинтетических изменений. Предобработка фузикокином существенно не влияла на параметры ВП, однако увеличивала амплитуду ответа уровня ассимиляции CO_2 и нефотохимического тушения. Таким образом, инактивация H^+ -АТФазы плазматической мембраны может рассматриваться как механизм развития вызванного ВП ответа фотосинтеза у проростков гороха. Исследование влияния ортованадата натрия на фотосинтетические параметры в изолированных протопластах показало, что добавление ортованадата вызывает рост нефотохимического тушения и снижение квантовых выходов фотосистем I и II.

Таким образом, снижение активности H^+ -АТФазы является важным механизмом влияния ВП на фотосинтез. Данное влияние может быть связано с изменениями рН апопласта и цитоплазмы. Рост рН апопласта, вероятно, меняет активность карбоангидраз и/или аквапоринов, а также отношение CO_2/HCO_3^- . Влияние закисления цитоплазмы на фотосинтез может проявляться в закислении стромы и люмена хлоропластов, что может приводить к ингибированию ряда ферментов цикла Кальвина, изменению локализации и активности ферредоксин-НАДФ-редуктазы, а также к усилению нефотохимического тушения флуоресценции.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект №14-26-00098).

**Биофизика одиночных молекул.
Нанобиотехнологии**

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ДИ-ГЛЮКОЗЫ С ОКСИДОМ ЖЕЛЕЗА

Structure of complexes CI-glucose with oxide of iron

Аббасова Г.Д., Гаджиева Л.С.

Кафедра оптики и молекулярной физики, Бакинский Государственный Университет,
ул.З.Халилова,23, AZ1148, Баку, Азербайджан
Тел.(+99412539), e-mail: lala-h@mail.ru

Актуальной проблемой современной наномедицины является поиск и создание новых классов лекарственных препаратов, используемых в терапии онкологических заболеваний, с целью их адресной доставки к раковым клеткам. Для решения таких проблем используются носители противоопухолевых препаратов, которые бы защищали лекарственное средство от воздействий ферментов и предотвращали их биодеструкцию в биологических жидкостях, например, в крови. В работе[1] авторы использовали связывающийся с опухолевой клеткой пептид, состоящий из пяти аминокислотных остатков Cys–Arg–Glu–Lys–Ala. В экспериментах использовалась комплексная система, в которой пептид связывался с покрытыми декстраном наночастицами оксида железа. В качестве покрытия наночастиц используется декстран ($C_6H_{10}O_5$)_n–полимер глюкозы, вырабатываемый разными видами бактерий семейства стрептококковых *Streptococcaceae*.

В данной работе методами молекулярного моделирования и полуэмпирическими методами квантовой химии исследована пространственная и электронная структура мономерной единицы декстрана–глюкозы, ди-глюкозы, изучены их координационные комплексы с оксидом железа Fe₂O₃. Электронная структура глюкозы и ди-глюкозы была рассчитана на основе координат равновесных конфигураций ядер, полученных в результате оптимизации геометрии молекулы в потенциалах полуэмпирического метода молекулярной механики MM+. Полученные результаты были использованы для расчетов параметров электронной структуры и величин дипольных моментов координационных комплексов глюкозы и ди-глюкозы с оксидом железа (Fe₂O₃). Расчеты были проведены методом квантовой химии PM3, параметризованным для атомов переходных металлов с помощью демонстрационной версии программы HyperChem 7.5, доступной на сайте корпорации Hypercube (<http://www.hyper.com/>).

Комплекс ди-глюкозы с Fe₂O₃ характеризуется следующими значениями геометрических параметров: (1) длины связей Fe=O и Fe-O в комплексе с ди-глюкозой принимают значения 1.73 Å и 1.85 Å (соответственно, вместо значений 1.49 Å и 1.77 Å для свободного Fe₂O₃); (2) валентный угол Fe-O-Fe в комплексе принимает значение 119.36°; (3) валентный угол O=Fe-O равен 119.0°; (4) при образовании комплекса наблюдается перераспределение зарядов на атомах Fe₂O₃ по сравнению со свободным оксидом железа.

1. Simberg, D., Duza, T., Park, J.H., Essler, M., Pilch, J., Zhang, L., Derfus, A.M., Yang, M., Hoffman, R.M., Bhatia, S., Sailor, M.J., and Ruoslahti, E., Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors, PNAS, 2007, vol. 104, no. 3, pp. 932-936.

ВОЗДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**The impact of different silver nanoparticles on pathogens****Барбин Н.М., Чирков А.А.**

Уральский государственный аграрный университет, 620075, г. Екатеринбург, ул. К.Либкнехта, 42
E-mail: NMBarbin@mail.ru, Chirkov-aleksey@yandex.ru

В настоящее время на фоне повышенной и регулярно возрастающей устойчивости к антибиотикам у большинства бактерий, разработка препаратов на основе наночастиц серебра является перспективным направлением [1, 2].

Серебро обладает бактерицидным воздействием по отношению более чем к 500 видам бактерий. Эффект уничтожения бактерий препаратами с серебром в 1500 раз выше действия такой же концентрации фенола (C_6H_5OH) и в 3,5 раза выше действия сулемы ($HgCl_2$). Эффект серебра определяются двумя основными параметрами: концентрацией и размерами наночастиц.

Существуют различные методики получения наночастиц серебра, в результате которых получают частицы с размером от 1 до 200 нм [3].

Для получения наночастиц серебра использовали следующие методы:

Цитратный метод.

К кипящему раствору $AgNO_3$ в процессе непрерывного размешивания по каплям добавляют $Na_3C_6H_5O_7$. В результате химической реакции наблюдается изменение цвета раствора от бесцветного к желтому, что говорит о восстановлении ионов серебра.

Цитратно – сульфатный метод Кери Ли;

Смешивают растворы $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ с концентрацией 1% и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ с концентрацией 6 г/л. Затем добавляют полученную смесь к раствору $AgNO_3$ и интенсивно перемешивают.

Восстановление боргидридом натрия

Растворы $AgNO_3$ и $NaBH_4$ смешивают, энергично встряхивая колбу (способствуют образованию монодисперсных частиц серебра).

Определяли биологическую активность полученных разными способами наночастиц серебра.

Для этого делали посев культуры микроорганизмов золотистого стафилокока в чашки Петри на подложке. Затем на нее капали раствор наночастиц серебра и наблюдали прозрачные зоны гибели микроорганизмов. Наибольшую активность показали наночастицы серебра полученные цитратным методом.

1. Барбин, Н.М. и Чирков, А.А., Подавление патогенной микрофлоры препаратами на основе наночастиц серебра, Сборник материалов международной научно – практической конференции «Рациональное использование природных и биологических ресурсов в сельском хозяйстве», г. Екатеринбург, УрГАУ, 2014, сс. 179-181.
2. Чирков А.А. и Барбин Н.М., Действие препаратов на основе наночастиц серебра на микроорганизмы, Сборник материалов международной научно – практической конференции «Стратегические задачи аграрного образования и науки», г. Екатеринбург, УрГАУ, 2015, сс. 481-483.
3. Рубин, А.Б., Нанобиотехнологии: практикум, М.: Бином, 2012, 384 с.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ (ПЭ) ПОЛИСТИРОЛСУЛЬФАТА СО СТЕПЕНЬЮ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ 8 И ПОЛИАЛЛИЛАМИНА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 6 КДА НА ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ

To study the effect of polyelectrolytes (PE) polystyrenesulfonate with the degree of polymerization of 8 and polyallylamine with molecular mass 6 kDa on mitochondrial function

Бахромеева А. А., Контаров Н. А., Юминова Н. В., Зверев В. В.

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» РАМН, Россия 105064, Москва, Малый Каменный переулоч, д.5а

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния полиэлектролитов (ПСС-8, ПАА 6кДа), обладающих противовирусным действием, на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях, с последующим определением диапазона нетоксической концентрации для данных полиэлектролитов.

Дыхание и фосфорилирование митохондрий регистрировали полярографическим методом. Были получены следующие значения: при 0 концентрации ПСС-8- ДКл- $3,02 \pm 0,17$; ДКч- $3,00 \pm 0,16$; АДФ/О- $2,40 \pm 0,10$, а при концентрации 20мМ- $2,92 \pm 0,12$; $2,86 \pm 0,14$; $2,29 \pm 0,11$ соответственно. При 0 концентрации ПАА 6кДа- ДКл- $3,04 \pm 0,18$; ДКч- $3,01 \pm 0,16$; АДФ/О- $2,52 \pm 0,12$, а при концентрации 10мМ- $2,95 \pm 0,12$; $2,84 \pm 0,17$; $2,37 \pm 0,12$.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что при увеличении концентрации ПСС-8 более 20мМ, а ПАА 6кДа более 10мМ, приводило к значимому снижению дыхательных коэффициентов по Ларди-Вельману (ДКл) и Чансу- Вильямсу (ДКч), в одинаковой степени снижался и показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования АДФ/О.

При концентрациях ПЭ от 1 до 20 мМ для ПСС-8 и от 1 до 10 мМ для ПАА снижения показателей окислительного фосфорилирования не происходило.

Регистрируемое снижение показателей, характеризующих сопряжение процессов дыхания и фосфорилирования, позволяет говорить о наличии серьезных органических нарушений в дыхательной цепи и мембране митохондрий. Таким образом был определен нетоксический диапазон концентраций, для ПСС-8 от 1 до 20 мМ, а для ПАА от 1 до 10 мМ при котором сохранялось противовирусное действие указанных ПЭ.

МОДЕЛЬ ДИПОЛИКА В БИОФИЗИКЕ

Dipolic model in biophysics

Белобров П.И.1,2

1 – Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, ул. Академгородок, 50, стр. 50

2 – МОЛПИТ, Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Тел.: +7(906)910-36-14; факс: +7(391)206-21-66; e-mail: peter.belobrov@gmail.com

Понятие диполика как модельного вещества было введено в [1] на основе результатов, полученных в [2, 3]. Диполик – модельное вещество, все физические свойства которого определяются только диполь–дипольным взаимодействием. Точное решение для основного состояния кубического диполика найдено в [2], где было показано, что существует непрерывное вырождение основного состояния по двум параметрам. Самоорганизация 2D диполика с 3D полями с произвольным углом ромбичности численно исследована в [3]. Методами теории гомологий доказано существование вихревых состояний в таких диполиках. Аналитически найдено точное решение для метастабильных структур без дисклинаций, связанное с семейством попарно зацепляющихся кривых, вдоль которых параметр порядка сохраняется [1].

В задаче определения основного состояния 3D полей, создаваемых классическими диполями на бесконечной 2D решетке, основное состояние зависит от характера предельного перехода, параметр которого – способ компактификации 2D диполика в пространстве E^3 . Основные компактификации E^2 , вложенные в E^3 и E^4 : сферическая S^2 , торическая T^2 и проективная RP^2 [1]. Найденная зависимость основного состояния 3D диполика с 3D полями от компактификации является, пожалуй, единственным точным результатом для бесконечных систем с дипольным взаимодействием всех частиц со всеми, имеющим прямое отношение к одиночным молекулам – диполикам.

С понижением размерности пространства энергия основного состояния, нормированная на частицу, увеличивается, и происходит частичное снятие вырождения, т.е. непрерывное вырождение по двум переменным становится в 2D случае вырождением только по одной переменной, а в одномерном случае вырождение снимается полностью. Особым случаем является 3D кубический кластер, в котором остается вырождение по одному параметру.

Рассмотрение конечного диполика как одиночной молекулы позволило доказать важную роль беспокойного состояния нескольких систем, интересных для биофизики и нанобиотехнологии. Применение построенной модели дало возможность выяснить механизм «кажущейся» специфичности наноалмаза при взаимодействии с белками и ДНК. Этот результат служит основой более точного рассмотрения биологических взаимодействий множества молекул в конденсированной фазе клетки.

Исследование выполнено по гранту Российского научного фонда (проект №15-19-10041).

1. Belobrov, P.I., Ermilov, I.V., and Tsikh, A.K., Preprint TRITA/MAT-91-0020, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 1991, 25 p. <http://molpit.org/page/36>.
2. Belobrov, P.I., Gekht, R.S., and Ignatchenko, V.A., JETP, 1983, vol. 57, pp. 636-642.
3. Belobrov, P.I., Voevodin, V.A., and Ignatchenko, V.A., JETP, 1985, vol. 61, pp. 522-524.

МАГНИТНАЯ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ КЛЕТОК SACCHAROMYCES CEREVISIAE МАРКИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Magnetic susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* cells marked with magnetic nanoparticles

Беспалова С.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В.

Донецкий национальный университет, 83055, г. Донецк, ул. Университетская, 24

e-mail: yu-legen@mail.ru

В последние годы актуальны исследования, связанные с приготовлением магнитоуправляемых адсорбентов, биокатализаторов и биосенсоров, которые имеют широкий спектр экологического и биотехнологического применения [1-3]. Эти объекты интересны тем, что ими можно манипулировать с помощью приложения внешнего магнитного поля. Для придания биологическим объектам магнитных свойств производят процедуру магнитомаркирования, суть которой заключается в связывании определенного магнитного материала на поверхности клетки или в цитоплазме. На данный момент считается, что наилучшим веществом для магнитомаркирования клеток являются магнитные наночастицы оксидов железа, обладающие суперпарамагнитными свойствами (СПИО) [1-3]. В настоящей работе в качестве объекта для магнитомаркирования использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, так как, во-первых, они уже давно закрепились в роли модельного объекта в биологических исследованиях и во-вторых, дрожжи являются эффективным адсорбентом тяжелых металлов, что делает возможным применение их в роли очистителя загрязненных вод. Поэтому создание магнитоуправляемых дрожжей может иметь огромный потенциал для практического применения. В работе исследовано влияние внеклеточной концентрации магнитомаркирующих частиц на магнитную восприимчивость χ маркированных дрожжевых клеток. Процедура синтеза СПИО производилась при совмещении двух методов, описанных в работах [4, 5]. Готовили 0.5 % масс раствор смеси солей FeCl_2 и FeCl_3 в мольном соотношении 1:2. После этого в раствор вносили 1 мл ТМАГ. Затем перемешивали раствор с помощью магнитной мешалки. В процессе перемешивания медленно по каплям добавляли водный раствор аммиака. После образования осадка надосадочная жидкость сливалась, а осадок трехкратно промывался дистиллированной водой. После этого в осадок магнетита дополнительно вносили 1 мл 25% ТМАГ. Дистиллированной водой доводили объём до 100 мл и перемешивали раствор. Полученный коллоидный раствор центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 минут с целью осадить крупные частицы. После центрифугирования надосадочную жидкость, содержащую наночастицы магнетита, сливали в отдельную колбу. Полученные наночастицы использовали для дальнейшего магнитомаркирования дрожжевых клеток. Процедуру магнитомаркирования дрожжей производили по аналогии с методикой, описанной в работе [3]. В настоящей работе проведена магнитная модификация дрожжевых клеток с помощью наночастиц оксида железа при изменении концентрации внеклеточного железа C_{Fe} . С помощью измерения магнитофоретической скорости движения таких клеток в высокоградиентном магнитном поле с силовым фактором порядка $10 \text{ T}^2/\text{м}$ определена магнитная восприимчивость χ магнитомаркированных дрожжевых клеток. Установлено, что, при увеличении C_{Fe} в диапазоне от 1.2 до 6 мМ, χ изменяется в диапазоне от $6 \cdot 10^{-5}$ до $3 \cdot 10^{-4}$. Показано, что с увеличением C_{Fe} в исследованном диапазоне, скорость движения в градиентном поле и магнитная восприимчивость маркированных клеток возрастает линейно. Проведен анализ жизнеспособности магнитных клеток путём их посева на твёрдой питательной среде.

1. Pospiskova, K. and Prochazkova, G., Letters in Applied Microbiology, 2013, no. 56, pp. 456-461.
2. Naumenko, E.A. and Dзамукова, M.R., Implantable Bioelectronics, 2014, pp. 7-26.
3. Safarikova, M. and Maderova, Z., Food Research International, 2009, no. 42, pp. 521-524.
4. Петракова, А.В., Урусов, А.Е., и Костенко, С.Н., Современные проблемы науки и образования, 2013, №5, сс. 675-682.
5. Adelman, N.B., Journal of Chemical Education, 1999, vol. 76, no. 7, pp. 943-948.

ТРИТИЕВАЯ ПЛАНИГРАФИЯ И НАНОБИОКОМПЛЕКСЫ**Tritium planigraphy and nanobiocomplexes****Богачева Е.Н., Долгов А.А., Богачев А.Н., Шишков А.В.**

Институт химической физики им. Н.Н.Семенова Российской академии наук, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, 4

Тел.: +7(499)939-72-14; факс: +7(499)137-35-45; e-mail: bogen_chph@mail.ru

Метод тритиевой планиграфии, основанный на неселективном замещении атомов водорода на тритий в поверхностном слое макромолекулы на глубине 3–5 Å, дает возможность получить информацию о поверхности, ориентации и локализации белков [1–4]. Этим методом установлено расположение компонентов сложных нанобиокомплексов, таких как, рибосома, хромосома, клетка и вирус [1, 2]. Для интерпретации полученных результатов создан компьютерный алгоритм, имитирующий анизотропные условия бомбардировки пучком горячих атомов трития белков с учетом ориентации молекулы белка относительно поверхности и ослабления потока атомов трития по мере прохождения границы фаз.

Разработан новый подход к воссозданию пространственной структуры и организации макромолекул в составе химических и биологических систем, синтезирующий экспериментальные данные и компьютерное моделирование. Предложен полуэмпирический алгоритм построения пространственной структуры белков [5, 6], включающий следующие стадии:

1. экспериментальное определение профиля доступности аминокислотных остатков при бомбардировке белка пучком атомов трития;
2. теоретическое предсказание элементов вторичной структуры белка;
3. определение профиля доступности аминокислотных остатков в изолированных элементах вторичной структуры путем компьютерной имитации эксперимента;
4. сборка элементов вторичной структуры в компактную модель с учетом локализованных областей контакта;
5. минимизация энергии и предсказание пространственной структуры белка с помощью программы Rosetta, модифицированной данными по доступности тритию отдельных аминокислотных остатков.

С помощью разработанного подхода, метода тритиевой планиграфии и компьютерного моделирования установлена пространственная структура в растворе и вирионе одного из важных белков вируса гриппа – белка М1. Найдены отличия в структуре белка в растворе, в кристалле и составе вириона *in situ*.

1. Баратова, Л.А., Богачева, Е.Н., Гольданский, В.И., Колб, В.А., Спирин, А.С., и Шишков, А.В., Тритиевая планиграфия биологических макромолекул, М.: Наука, 1999, 175 с.
2. Shishkov, A.V. and Bogacheva, E.N., Tritium planigraphy of biological macromolecules in: Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Conformational Stability, Size, Shape and Surface of Protein Molecules, Uversky, V.N. and Permyakov, E.A., Eds., N.-Y.: Nova Science Publishers, 2007, pp. 317-353.
3. Богачева, Е.Н. и Шишков, А.В., Молекуляр. биология, 2000, т. 34, №5, сс. 839-855.
4. Богачева, Е.Н., Гедрович, А.В., и Шишков, А.В., Коллоидн. журнал, 2004, т. 66, №2, сс. 164-169.
5. Богачева, Е.Н., Гольданский, В.И., и Шишков, А.В., Химическая физика, 2003. т. 22, №2, сс. 8-15.
6. Bogacheva, E.N., Goldanskii, V.I., Shishkov, A.V., Galkin, A.V., and Baratova, L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, pp. 2790-2794.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ С АРОМАТИЧЕСКИМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Study of the C₆₀ fullerene complexation with aromatic biologically active compounds

Воронин Д.П.1, Пашкова И.С.1, Бучельников А.С.2, Мосунов А.А.1, Песик Я.З, Прилуцкий Ю.И.4, Евстигнеев М.П.1,2

1 – ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, ул. Университетская, 33, г.Севастополь, 299053

2 – Белгородский государственный исследовательский университет, пр.Победы, 85, г.Белгород, 308015

3 – Университет Гданьска, г.Гданьск, 80-822, Польша

4 – Киевский национальный университет им.Тараса Шевченко, г.Киев, 01601, Украина

e-mail: max_evstigneev@mail.ru

Фуллерен C₆₀ представляет собой одну из аллотропных форм углерода, нашедший широкое применение в различных областях современной нанотехнологии, включая нанобиотехнологию. Благодаря возможности получения стабильных водных коллоидных растворов немодифицированного фуллерена было обнаружено, что фуллерен C₆₀ обладает противоопухолевым действием и в этом смысле перспективен для использования в химиотерапии. Однако недавно было обнаружено, что введение водного раствора немодифицированного фуллерена *in vitro* совместно с некоторыми ароматическими ДНК-связывающимися препаратами существенно влияет на их биологический отклик [1]. На *in vivo* уровне этот синергизм проявляется в усилении противоопухолевого эффекта антибиотика доксорубицина, что по своей сути открывает перспективу внедрения нового режима комбинированной фуллереновой химиотерапии рака. Согласно предварительным результатам [1,2], механизм наблюдаемого синергизма обусловлен нековалентным комплексобразованием кластеров фуллерена C₆₀ с молекулами препарата; при этом кластеры выполняют роль системы доставки препарата к больным клеткам.

В настоящей работе [3-5] нами было проведено расширенное физико-химическое исследование комплексобразования C₆₀ с различными ароматическими биологически активными соединениями как потенциального механизма медико-биологического синергизма при их совместном использовании. Для получения параметров комплексобразования использовались методы ЯМР-спектроскопии, спектрофотометрии, изотермической калориметрии титрования, динамического светорассеяния, малоуглового рассеяния нейтронов. Выявлена природа сил, стабилизирующих комплексы, а также специфика структуры образуемых комплексов в растворе.

1. Panchuk, R.R., Prylutska, S.V., et al., J. Biomed. Nanotechnol., 2015, vol. 11, pp. 1139-1152.
2. Prylutska, S., Grynuk, I., et al., Drugs R&D., 2014, vol.14, pp. 333-340.
3. Evstigneev, M.P., Buchelnikov, A.S., et al., Chem. Phys. Chem., 2013, vol. 14, pp. 568-578.
4. Prylutsky, Yu.I., Evstigneev, M.P., et al., Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, vol. 16, pp. 23164-23172.
5. Prylutsky, Yu.I., Evstigneev, M.P., et al., J. Nanoparticle Res., 2015, vol. 17, pp 45-9.

ФОРМИРОВАНИЕ КЛАСТЕРОВ [LYS3]GA В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ ПО ДАННЫМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**Cluster formation by [Lys3]gA in liposomes, as revealed by cryo-EM****Глухов Г.С.1, Печникова Е.В.2, Антоненко Ю.Н.3, Соколова О.С.1**

1 – Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

2 – Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва, 119333, Россия

3 – Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

Тел.: +7(495)939-57-38; факс: +7(495)939-57-38

В данном исследовании использовали просвечивающую криоэлектронную микроскопию для изучения липосом, содержащих грамицидин А и мутантный грамицидин А с лизином в позиции 3 ([Lys3]gA). Изображения липосом с различными вариантами грамицидина получали при 52000-кратном увеличении в 120-kV Tecnai G-12 Spirit (FEI) микроскопе с дозой электронов в районе $10 \text{ e}/\text{Å}^2$ и дефокусом 3,5 мкм. В отличие от липосом с грамицидином, липосомы с [Lys3]gA имели в составе электронноплотные кластеры. Было собрано около 3000 частиц мембран липосом с размерами 64x64 пикселя. Дальнейший анализ производился при помощи программы IMAGIC-5. Реконструкция показала наиболее вероятное пентамерное строение кластеров ([Lys3]gA, с центральной порой порядка 3Å в диаметре).

В соответствии с предлагаемой моделью неселективной поры, электронные изображения [Lys3]gA в липосоме были аппроксимированы пентамером, состоящим из антипараллельных правозакрученных димеров ДН (пентамер состоит из 10 мономеров), стабилизированным посредством взаимодействия большого количества триптофанов и катион-пи взаимодействием между триптофаном и лизином соседних димеров.

Работа поддержана грантом РФФ (№14-14-00234).

ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ В СОСТАВЕ АССОЦИАТОВ С АБИОГЕННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ УГЛЕРОДА

Interaction effects of globular proteins in the associates with abiogenic carbon nanoparticles

Горюнов А.С.1, Рожков С.П.1, Борисова А.Г.1, Рожкова Н.Н.2

1 – Институт биологии Карельского НЦ РАН, 185610, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

2 – Институт геологии Карельского НЦ РАН, 185610, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Тел.: +7(814)276-52-64; факс: +7(814)276-98-10; e-mail: goryunov@krc.karelia.ru

Взаимодействия, возникающие при образовании нанобиоконъюгатов и белковой «короны» на поверхности различных абиогенных наночастиц в водных дисперсиях вызывают разнообразные биофизикохимические эффекты, которые в значительной степени определяют характер биологического действия наноматериала на более высоких уровнях организации биологических систем. Это обуславливает необходимость изучения таких эффектов для всех наноматериалов в различных областях жизнедеятельности. Шунгитовый углерод (ShC), известный благодаря косметическому и курортологическому использованию, далеко не всегда обоснованному с биомедицинской точки зрения, является источником наноматериала, особенности механизма биологического действия которого остаются неизученными. Появляется все больше указаний на то, что водная нанодисперсия ShC содержит 20-100 нм агрегаты глобул, которые образованы стопками размером ~1,5 нм, состоящими из 5-6 нанолისტков ~0,7 нм восстановленного оксида графена – базового структурного элемента ShC [1,2]. Структурно-динамические, термодинамические, гидродинамические и окислительно-восстановительные эффекты ShC в белковых растворах и клеточных суспензиях *in vitro* исследовались в сравнении с эффектами С60 и нанодIAMAZOV.

Так, показано, что восстановление стабильного спин-зонда до соответствующего гидроксиламина в присутствии Fe(II) в водном растворе и в липидном бислое мембраны эритроцита, а также последующее окисление гидроксиламина значительно усиливается с ростом концентрации ShC. Адсорбция сывороточного альбумина (СА) на наночастицах ShC приводит в течение нескольких минут к образованию ассоциата и двухслойной белковой короны, размер которой зависит от концентрации белка и присутствия жирных кислот (ЖК). Изучение автоокисления гемоглобина (Hb) показало, что окисление Fe(II) усиливается и концентрация окисленного Hb существенно растет с увеличением содержания ShC в нанодисперсии. Это указывает на прооксидантный эффект ShC. Анализ путей автоокисления гемовых белков позволяет предполагать, что вероятный механизм эффекта связан с ролью ShC как акцептора электрона и рН-независимым переносом электрона с деоксигема на кислород [3]. По данным дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и ЭПР спин-зондов СА взаимодействует с наночастицами ShC по центрам связывания ЖК, причем доменная структура СА претерпевает разнонаправленные изменения. Термостабильность белков цитоскелета возрастает в присутствии ShC (ДСК), оставаясь неизменной для мембранных белков эритроцита, хотя целостность мембраны по данным термогемолиза несколько снижается. Эти и другие результаты свидетельствуют о неоднозначном характере биологического действия наноматериалов на основе ShC и требуют тщательного учета при контакте с биосистемами.

Работа поддержана грантом РФФИ №13-03-00422.

1. Razbirin, B.S., Rozhkova, N.N., et al., J. Exp. Theor. Phys., 2014, vol. 118, p. 735.
2. Razbirin, B.S., Rozhkova, N.N., et al., Nanosystems, 2014, vol. 5, p. 217.
3. Rozhkov, S.P. and Goryunov, A.S., Rus. J. Gen. Chem., 2013, vol. 83, p. 2585.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОМЕРОВ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА МЕТОДАМИ КВАНТОВОЙ МЕХАНИКИ**Comparative analysis of Quercetin and Dihydroquercetin isomers using Quantum Mechanics methods**

**Дерябина А.С., Гонсалес Хименес Э., Солис Тобон М., Паласиос Кортэ В., Полтев В.И.
Deriabina A., Gonzalez Jimenez E., Solis Tobon M., Palacios Corte V., Poltev V.**

Faculty of Physical and Mathematical Sciences, Autonomous University of Puebla, Ciudad Universitaria, CP 72592, Puebla, Pue. Mexico

Тел./факс +52(222)229-55-00; доп. 2155; e-mail: aderiabina@fcfm.buap.mx

Quercetin (Q) is one of the most abundant flavonoids in the human diet, which has multiple beneficial properties (antioxidant and anti-inflammatory, for example) and there are evidence that Q can be efficient at treating cancer by inducing cell death or cell cycle arrest preferentially in cancer cells versus their normal counterparts [1]. For example, an experimental study [2] has shown that the presence of Q activates IRE1-RNase (the protein responsible for triggering the autophagy action) and enhances the activation of the IRE1-RNase by ADP, its natural ligand. However, its derivative Dihydroquercetin (DHQ) shows no activity while at the same system. In this work we analyze the differences of internal properties of these molecules to clarify the causes of this dissimilarity. The internal energy optimizations were carried out using three different methods of quantum mechanics: HF, MP2 and B3LYP (basis sets 6-31G(d,p) and 6-311G++(d,p)). The B3LYP functional is the one of the most common use for the calculus in flavonoids. However, oyp results obtained with this method differ greatly from both the experimental data and the predictions obtained with the more exact MP2 method. On other hand, the outcomes obtained using HF methods are consistent with MP2 results.

The general features of the Q geometry can be obtained from the X-ray structure [2], however, the orientation of the B-ring (*syn* or *anti* respect to the mutual alignment of O3 and O3' atoms) and the hydroxyl groups' orientations (other than those involved into the hydrogen bonds formation) could not be determined with experimental resolution. The similar situation is observed for the DHQ experimental data [3]. Due to this, different arrangements of the five hydroxyl groups (the active sites) of Q and DHQ were considered in this study. As the result, we selected six different structures for both flavonoids, all of them are less favorable in energy values than the global minimum structure no more than 4.5 kcal/mol. These are the most probable candidate for the further calculus. Four of these structures prefer to remain at *syn* configuration. The analysis of the energy profiles of the B-ring rotation demonstrates that the average barriers between *syn* and *anti* positions of the ring are of 4.2 for MP2, 4.0 for HF and 5.3 kcal/mol for B3LYP methods. The use of the larger basis set decreases these barriers.

Acknowledgements: this work has been supported by LNS-BUAP, VIEP-BUAP, PIFI.

1. Russo, M., Spagnuolo, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 2012, vol. 83, pp. 6-15.
2. Wiseman, R. L., Zhang, Y., et al., *Mol. Cell*, 2010, vol. 38, pp. 291-304
3. R. C. Wilmouth, J. J., Turnbull, et al., *Structure*, vol. 10, no. 1, pp. 93-103.

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНООБЪЕКТОВ

The spatial characteristics of nanoobjects

Долгов А. А.

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, 119991, Москва, Косыгина, 4

Тел.: +7(495)939-72-14; факс: +7(499)137-35-45; e-mail: dolgov48@nm.ru

Объект проявляет свои свойства при взаимодействии с внешней средой. При этом существенную роль играют его пространственные характеристики – параметры, имеющие размерность длины в произвольной степени и описывающие пространство, занимаемое объектом. В частности, одной из задач современной биоинформатики является классификация пространственных структур белков, а также их комплексов с ДНК, РНК и лигандами. Важность этой задачи связана с тем, что имеющие сходное строение белки часто выполняют сходные функции. Под нанообъектами подразумеваются объекты, размер которых хотя бы в одном измерении находится в нано-диапазоне (как правило, 1-100 нм), характеризующиеся диапазонами размеров, форма, морфология и состав.

Проведен анализ пространственных характеристик и структурных факторов таких нанообъектов, как биомолекулы, хотя на общность полученных результатов это не влияет. Естественным условием представляется определение их из прямого опыта. В частности, радиус гирации R_g , определяемый как среднее расстояние между атомами в молекуле. На базе анализа экспериментальной зависимости R_g глобулярных белков от молекулярного веса показано, что это семейство должно обладать средним числом около 180 аминокислотных остатков с широкой дисперсией, что подтверждается опытом.

В пионерской работе Фишера [1] показано, что форма белков из-за наличия гидрофильной оболочки зависит от размеров. Этот подход был развит при более жестких допущениях в [2]. На примере С-домена белка М1 вируса гриппа [3] излагается методика оценок геометрических характеристик одной части системы, если они известны для всей системы и другой ее части, на основе опытных значений радиуса гирации и/или коэффициента седиментации. Сравнение полученных результатов для H_2 со значением, рассчитанным по данным малоуглового рентгеновского рассеяния – 7.0 нм, показывает, что все оценки, полученные на основе независимых экспериментальных данных коэффициента седиментации или радиуса гирации, достаточно близки, причем наилучшее приближение дает модель с использованием радиуса гирации.

1. Fisher, H.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1964, vol. 51, p. 1285.
2. Dolgov, A.A., Book of abstracts RSCM 2010, Moscow Region State University, Russia, 22-26 September, 2010, p. 112.
3. Shtykova, E.V., Baratova, L.A., Dolgov, A.A., et al., PLOS One, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0082431.

**МНОГОМЕРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ
ПО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЮ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ****Multivariate statistical analysis of experimental data on complexation of biologically active aromatic compounds*****Евстигнеев В.П.1, Евстигнеев М.П.1***

1 – Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, ул. Университетская, 33
Тел.: +7(8692)43-51-10; факс: +7(8692)24-35-90; e-mail: vald_e@rambler.ru

Процесс самосборки низкомолекулярных соединений лежит в основе механизма формирования надмолекулярных структур с управляемыми физическими свойствами и находит широкое применение в ряде биологических приложений [1]. Ярким примером одномерной самосборки является класс ароматических биологически активных молекул, демонстрирующих выраженную агрегацию в водном растворе (само- и гетероассоциация) за счет энергетически выгодного параллельного расположения хромофоров в агрегатах [2].

Успех управляемого биологического эффекта такого класса соединений обеспечивается глубиной физических представлений о процессах, протекающих в растворе, и качеством разрабатываемых на их основе теоретических моделей, которые связывают параметры динамического равновесия с экспериментально наблюдаемым параметром. Зачастую в выборе той или иной модели исследователю необходимо принимать решение только на основе экспериментальных данных.

В работе представлены результаты многомерного статистического анализа данных ЯМР по комплексообразованию ряда биологически важных молекул. На основе метода главных (МГК) и независимых (МНК) компонент, предложен способ извлечения из экспериментальных ЯМР-данных эмпирической информации, необходимой для последующего теоретического анализа процессов агрегации в растворе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №15-33-20284).

1. Schneider, H.-J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, vol. 48, pp. 3924-77.
2. Evstigneev, M.P., *Int. Rev. Phys. Chem.*, 2014, vol. 33, no. 2, pp. 229-273.

ОБРАЗОВАНИЕ НАНОГИБРИДОВ ОКСИД ГРАФЕНА (ГО)/ ГИДРОКСИАПАТИТ КАЛЬЦИЯ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ: МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГА И ГО

Origin of grapheme oxide (GO)/calcium hydroxyapatite (HA) nanohybrids in water solutions: *in vitro* modeling of HA and GO interacion

Захаров Н.А., Ежова Ж.А., Коваль Е.М., Захарова Т.В.

Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, 119991, Москва, Ленинский просп. 31

Тел.: +7(495)955-48-84; факс: +7(495) 954-12-79; e-mail: zakharov@igic.ras.ru

Композиционные материалы (КМ) на основе гидроксиапатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) и наноглеродных материалов – углеродных нанотрубок (УНТ) и оксида графена (ГО) – представляются перспективными для использования в качестве костных имплантатов с улучшенными механическими характеристиками [1]. В частности, УНТ близки по размерам волокнам коллагена нативной кости. Их плотность значительно ниже плотности титана и стали, применяемых для замены кости, и близка к плотности графита. Прочностные характеристики УНТ предположительно могут способствовать улучшению механических характеристик поврежденной кости. Аналогичные экспертные предположения высказаны и по поводу использования ГО для создания имплантатов на основе КМ ГА/ГО.

Перспективы использования ГО для получения КМ медицинского назначения ставят задачу определения особенностей его взаимодействия с костной тканью. В настоящем сообщении приведены данные о взаимодействии ГО с аналогом неорганической компоненты костной ткани млекопитающих – ГА.

Реакцию взаимодействия солей кальция и ГО проводили в системах $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-ГО-H}_2\text{O}$ под воздействием ультразвука (УЗ) (42 кГц) и в нативных условиях (37⁰С) без воздействия УЗ; $\text{CaCl}_2\text{-(NH}_4)_2\text{HPO}_4\text{-NH}_3\text{-H}_2\text{O-ГО}$ (25⁰С). По данным ЭСХА содержание углерода в исходном ГО составляло ~90 масс. %, кислорода ~10 масс. %.

Продуктом синтеза являлись наноразмерные КМ ГА/ГО, включающие в свой состав наноразмерный ГО и нанокристаллы ГА (НКГА) с содержанием ГО 0.1; 1.0; 2.0 и 5.0 масс. %. Продукты синтеза идентифицированы методами химического анализа, РФА, ИКС, ТГА, ДСК, ЭСХА, электронной микроскопии. Определено влияние состава на кристаллографические характеристики, размеры и морфологию НКГА в составе КМ ГА/ГО и проанализированы основные взаимосвязи состав – структура – дисперсность – свойства синтезированных КМ ГА/ГО.

Определение растворимости НКГА КМ ГА/ГО проводили в дистиллированной воде. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что ростом содержания ГО в КМ происходит изменение морфологии НКГА. НКГА удлинялись вдоль оси *c*, размер же в направлении, перпендикулярном гексагональной оси *c*, оставался практически неизменным.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ГО при взаимодействии с ГА увеличивает растворимость НКГА, сходных по размерам и габитусу с кристаллами НКГА нативной костной ткани млекопитающих. Величина растворимости НКГА в КМ ГА/ГО зависит от концентрации ГО в таких КМ и условий их синтеза. Это необходимо принимать во внимание при возникновении условий контакта ГО с нативными тканями человека и животных.

1. Захаров, Н.А. и Калинин, В.Т., Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии, т. 2, М.: МАКС Пресс, 2015, сс. 145-169.

УЛЬТРАМАЛЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА: ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**Ultrasmall gold nanoparticles: Evaluation of genetic activity**

Захидов С.Т.1, Муджири Н.М.1, Рудой В.М.2, Зеленина И.А.1, Дементьева О.В.2, Маршак Т.Л.3

1 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

2 – Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071, Москва

3 – Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 117334, Москва, ул. Вавилова, 26
e-mail: 4361.idb@bk.ru

Перспектива применения наночастиц золота (НЧЗ) в борьбе против злокачественных новообразований в настоящее время широко обсуждается. В идеале эти нанокорпускулы должны прицельно ликвидировать опухолевые клетки, избегая при этом прямого соприкосновения с нормальными здоровыми клетками. Однако прежде, чем НЧЗ будут внедрены в практику клинической онкологии, необходимо располагать убедительными доказательствами отсутствия у них способности к канцерогенезу, механизм которого во многих случаях может быть тесно связан с мутационными изменениями в генах и хромосомах. Отсутствие таких данных создаёт новую дополнительную угрозу генетической и репродуктивной безопасности человека.

Цель настоящей работы состояла в изучении мутагенного потенциала НЧЗ с помощью метода учета мейотических микроядер, сигнализирующих о наступлении грубых изменений в структуре хромосомного материала развивающихся мужских половых клеток.

Опыты проводили на самцах мышей-гибридов СВАхС57ВL/6. Подопытным животным однократно или многократно (ежедневно в течение 4-х сут) внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл гидрозоля НЧЗ размером 2-3 нм в концентрации 1×10^{15} ч/мл. Через 1 ч после последних инъекций НЧЗ части животных вводили химический мутаген дипин в генетически активной дозе 30 мг/кг. Отрицательным контролем служили мыши, которым также в течение 4-х сут вводили по 0,2 мл физиологического раствора, а позитивным контролем – мыши, подвергшиеся однократному воздействию дипина. Животных забивали на 14 сут после завершения последних инъекций. Регистрация потенциальных хромосомных мутаций велась в популяции округлых сперматид (ОС), клеток, которые в момент воздействий находились преимущественно на стадиях прелептотены-лептотены, т.е. на стадиях активного премейотического синтеза ДНК, являющихся наиболее генетически чувствительными стадиями сперматогенеза. Приготовление препаратов, их фиксацию, окрашивание и цитогенетический анализ проводили по ранее описанным методам [1].

Подсчеты показали, что в позитивном контроле частота встречаемости ОС с микроядрами составляла $3,9 \pm 1,1\%$, а в отрицательном – $1,0 \pm 0,3\%$. Однократное введение мышам НЧЗ вызывало увеличение ($6,3 \pm 2,4\%$), а в сочетании с дипином, наоборот, снижение частоты встречаемости ОС с микроядрами ($1,9 \pm 0,8\%$). Многократное введение животным только НЧЗ не приводило к изменению числа ОС с хромосомными аномалиями ($1,2 \pm 0,4\%$), однако в комбинации с дипином значительно увеличивало выход генетически аберрантных клеток ($7,0 \pm 1,2\%$).

Итак, полученные результаты показали, что ультрамалые НЧЗ, в зависимости от условий эксперимента, могут выступать в трех ипостасях: как мутаген, антимутаген и комутаген. Они подтверждают необходимость развертывания более широких исследований генетических и биологических эффектов НЧЗ с привлечением различных экспериментальных моделей.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ

The influence of carbon nanotubes on the model membrane structures

Зуева О.С.1, Сальников В.В.2,3, Осин Ю.Н.2, Зуев Ю.Ф.3.

1 – Казанский государственный энергетический университет, 420066, Казань, Красносельская, 51

2 – Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420000, Казань, Кремлевская, 18

3 – Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, 420111, Казань, Лобачевского 2/31
e-mail: ostefzueva@mail.ru

В настоящее время сфера применения углеродных нанотрубок (УНТ) стремительно расширяется. УНТ являются универсальным модификатором для придания веществам принципиально новых или значительно улучшенных физико-механических и физико-химических свойств, позволяющим создавать усовершенствованные строительные, полимерные и резинотехнические нанокпозиционные материалы, а также приводящим к улучшению свойств и эффективности использования нефтепродуктов. Столь широкое использование углеродных нанотрубок ставит вопрос об их воздействии на биологические объекты, в частности на мембранные структуры. Модельными системами для изучения некоторых структурных свойств биологических мембран могут служить поверхностно-активные вещества (ПАВ), которым свойственна спонтанная агрегация в различные упорядоченные наноструктурные образования – мицеллы, моно- и бислои, везикулы и т.д. [1], для которых, как и для биологических липидов характерно наличие поверхности раздела водной и неводной объемных фаз и резкая асимметрия проводящих свойств по отношению к этой поверхности. Мы промоделировали реакцию структуры биомембран на присутствие УНТ на примере цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ). ЦТАБ относится к соединениям «зеленой химии» и, в частности, применяется в производстве косметики, моющих средств, а также в качестве антисептика. При изучении наноструктур ЦТАБ в дисперсиях УНТ нами зафиксированы различные структурные состояния ПАВ при его спонтанной агрегации [2]. Исследование методом электронной микроскопии суспензий многостенных УНТ (концентрация 3 мг/мл) в растворах ЦТАБ с концентрацией 100 мМ позволило сделать следующие выводы. Ассоциаты молекул ЦТАБ формируют тонкие пластины (nanosheets) с характерным размером 40-50 мкм, образованные бислоями, внутри которых могут находиться молекулы воды, т.е. структуры, аналогичные биомембранам. Углеродные нанотрубки, которые, судя по их размеру, покрыты «шубой» из углеводородных радикалов ЦТАБ, в образовании пластин не участвуют. Они как бы выталкиваются на поверхность пластин. Однако, наряду с плоскими пластинами имеются пластины, образующие «цветочные структуры» (nanoflowers) того же размера. Структуры такого рода, характерные для нанокристаллов, для ассоциатов ПАВ не наблюдались. Существование особых точек роста – центров «цветочных структур», возможно, определяется именно углеродными наноструктурами. Это означает, что появление УНТ вполне может изменить геометрию мембранных структур, нарушая тем самым их мембранные свойства. Таким образом, широкое применение УНТ может вызывать нарушение деятельности биологических организмов, а значит, приводить к экологическим последствиям.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 15-29-01239).

1. Зуева, О.С., Рухлов, В.С., и Зуев, Ю.Ф., Коллоидные наносистемы, Наноматериалы и нанотехнологии в энергетике, т. 1, Казань: Казан. гос. энерг. ун-т, 2014, сс. 169-200.
2. Зуева, О.С., Осин, Ю.Н., Сальников, В.В., и Зуев, Ю.Ф., Фундаментальные исследования, 2014, № 11-5, сс. 1021-1027.

СОПРЯЖЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА РАЗЛИЧНОЙ ФОРМЫ С МОЛЕКУЛОЙ ДНК В РАСТВОРЕ И НА ПОДЛОЖКЕ**Conjugation of silver nanoparticles of different shapes with DNA molecule in a solution and on a surface**

Иконников Е.О., Ролич В.И., Касьяненко Н.А.

Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета Ульяновская ул. 1, Петродворец, 1985046 Санкт-Петербург

Телефон: 8(812) 428-43-88 факс 8(812)4287240; e-mail: evgeniy32-08@rambler.ru

Рассмотрение различных способов металлизации ДНК привлекает внимание исследователей как в связи с созданием различных сенсоров и датчиков, так и с использованием молекулы ДНК в новых технологиях в качестве матрицы для формирования различных наноструктур с уникальными оптическими свойствами. В частности, кроме сплошной металлизации может быть использована «мозаичная» металлизация полимерных цепей, которая представляет интерес для создания устройств и структур различного назначения (в области наноэлектроники, нанофотоники, информационных технологий и др.).

Целью данной работы была разработка способа металлизации ДНК с использованием наночастиц серебра различной формы, обладающих полосами плазмонного резонанса при разных длинах волн в оптическом диапазоне спектра. В качестве альтернативного подхода для формирования наночастиц серебра на молекуле ДНК использовали способ восстановления ионов серебра после их связывания с макромолекулой в растворе.

Для синтеза наночастиц серебра заданной формы осуществляли подбор оптимальных концентраций компонентов взаимодействия: ДНК, AgNO_3 , NaBH_4 , H_2O_2 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ и др. Присутствие наночастиц серебра в растворе проверяли по появлению полосы плазмонного резонанса (использовали спектрофотометр СФ-56). Кроме того, полученные системы исследовали с использованием комплекса люминесцентной и рамановской микроспектрометрии «Интегра Спектра» в междисциплинарном ресурсном центре по направлению «Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники» научного парка СПбГУ.

В работе показано, что при определенных условиях в растворе формируются наночастицы серебра треугольной, ромбической и сферической формы. При восстановлении наночастиц на ДНК после предварительного связывания ионов серебра показано, что непосредственно на молекуле ДНК формируются, главным образом, сферические частицы, тогда как при этом в растворе присутствуют наночастицы треугольной формы, не связанные с макромолекулой. Рассматривается влияние pH, а также присутствия поликатионов (в частности, сополимера виниламина и винилпирролидона) в растворе на результат металлизации.

Работа частично поддержана грантами РФФИ 13-03-01192 а, и СПбГУ11.38.644.2013

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НАНОПЕПТИДОВ СЕЛЕЗЕНКИ

Structure-functional organization of the spleen nanopeptides

Исмаилова Л.И., Аббаслы Р.М., Ахмедов Н.А.

Бакинский Государственный Университет, Институт физических проблем,

AZ-1148, Баку, ул. Ак. З.Халилова 23, Азербайджан

e-mail: Larisa_Ismailova@yahoo.com

В поддержании стабильного состояния живого организма основную роль играет иммунная система. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по поиску низкомолекулярных пептидов, обладающих активностью тимусных гормонов. Известно, что тимопоэтин – пептидный гормон, участвующий в регуляции иммунного ответа, влияющий на нейромышечную передачу и усиливающий дифференцировку Т-клеток, ингибируя при этом дифференцировку В-клеток. Наиболее коротким пептидным участком, который воспроизводит биологическую активность этого гормона, является пентапептид Arg32-Lys33-Asp34-Val35-Tyr36. Этот фрагмент проявляет себя как лекарственный препарат с иммуностимулирующим действием, однако, он быстро инактивируется в организме. Экспериментальные данные показали, что иммуностимулирующей активностью обладают и фрагменты этой молекулы N-концевой трипептид и тетрапептид. Из экстракта селезенки был выделен пентапептид Arg-Lys-Glu-Val-Tyr. Замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту приводит к потере биологической активности (на 10%). Одновременная замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту и остатка тирозина на триптофан приводит к сильной потере биологической активности (на 50%). Экспериментальные исследования показали, что синтетический тетрапептидный аналог тимопентина Lys-Asp-Val-Tyr демонстрирует полное отсутствие биологической активности, замена остатка Tyr на Trp в молекуле тимопентина резко сокращает биоактивность на 90%. А вот увеличение аминокислотной последовательности тимопентина на одну аминокислоту Arg воспроизводит полностью ее биологическую активность. Целью данной работы является выяснение структурно-функциональных свойств этих пептидов, что имеет большое прикладное значение в медицине и фармакологии. Полуэмпирический метод молекулярной механики позволил оценить пространственную структуру и конформационные возможности нанопептидной молекулы Arg-Lys-Asp-Val-Tyr и ее аналогов Arg-Lys-Glu-Val-Tyr, Arg-Lys-Asp, Arg-Lys-Asp-Val, Lys-Asp-Val-Tyr, Arg-Lys-Asp-Val-Trp, Arg-Lys-Glu-Val-Trp и Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-Arg. Для нахождения пространственного строения всех этих молекул использовалась разработанная нами компьютерная программа. Расчет проводился в рамках механической модели молекул с учетом невалентных, электростатических и торсионных взаимодействий и энергии водородных связей. Низкоэнергетические конформационные состояния монопептидов в каждой молекуле послужили основой для нахождения их пространственной структуры. Для каждой нанопептидной молекулы были найдены все возможные низкоэнергетические пространственные структуры. Были определены геометрические и энергетические параметры пептидов, а именно значения двугранных углов основной и боковых цепей аминокислот, входящих в молекулы, оценены величины энергии внутри- и межстаточных взаимодействий. Найденные низкоэнергетические конформации для каждой молекулы сопоставлялись с известными экспериментальными данными о выполняемых ими биологических функциях. Исследование конформационной динамики пептидов позволило определить наиболее подвижные боковые цепи нанопептидных молекул, способных принимать участие во взаимодействиях с соответствующими рецепторами.

ФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСАЖДЕНИЯ ЗАРЯЖЕННОГО НАНОАЭРОЗОЛЯ В ЛЕГКИХ**A physical model to study deposition of charged nanoaerosols in the lungs*****Канев И.Л., Морозов В.Н***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино Московской обл. 142290

E-mail: 4kanev@gmail.com

Существующие программы и физические модели легких не дают возможности сравнить осаждение электрически нейтрального и заряженного аэрозолей в легких животного. Для оценки степени осаждения заряженного аэрозоля в легких была изготовлена модель на основе высушенного свиного легкого производства компании Nasco. Наружный слой легкого толщиной 1 – 2 мм был удален, для обеспечения прохождения воздуха через открытые альвеолы. Долю осажденного аэрозоля рассчитывали, сравнивая распределение по размерам частиц 15 – 200 нм, прошедших сквозь легкое, с распределением частиц в контроле. Модельный наноаэрозоль был получен электрогидродинамическим распылением водного раствора глюкозы. Наночастицы, получаемые при распылении, частично нейтрализовали в газовой фазе ионами противоположного знака, получаемыми электрораспылением этанола [1]. Для удаления заряженных частиц аэрозоль пропусклся между пластинами конденсатора. С использованием описанной модели легкого было показано, что заряженный аэрозоль существенно лучше оседает в легких по сравнению с нейтральным: для нейтральных частиц диаметром 60 нм степень осаждения нейтральных частиц составляет 45%, положительно заряженных – 60%, для частиц диаметром 100 нм – 30% и 60%, соответственно. Достоверность модели была подтверждена совпадением результатов осаждения нейтральных наночастиц в модели сухого легкого с результатами моделирования в коммерческой программе Multiple-Path Particle Dosimetry [2].

1. Morozov, V.N., Kanev, I.L., Mikheev, A.Y., Shlyapnikova, E.A., Shlyapnikov, Y.M., Nikitin, M.P., Nikitin, P.I., Nwabueze, A.O., and van Hoek, M.L., Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances, *J. Aerosol Sci.*, 2014, vol. 69, pp. 48-61.
2. Anjilvel, S. and Asgharian, B., A multiple-path model of particle deposition in the rat lung, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1995, vol. 28, pp. 41-50; (b) National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Multiple Path Particle Dosimetry Model (MPPD v 1.0): A model for human and rat airway particle dosimetry. Bilthoven, The Netherlands, RIVA Report 650010030, 2002; (c) MPPD <http://www.ara.com/products/mppd.htm>

НЕВИРУСНЫЕ ГЕННЫЕ ВЕКТОРЫ: ОТ ПОЛИПЛЕКСОВ ДО МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Nonviral gene vectors: from polyplexes to multicomponent systems

Касьяненко Н.А. 1, Бакулев В.М.1, Назарова О.В.1, Некрасова Т.Н.2, Слита А.В.3, Унксов И.Н.1, Панарин Е.Ф..2

1 – Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, 198504, Санкт-Петербург, Петергоф, ул. Ульяновская, 1

2 – Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199037, Санкт-Петербург, Большой пр. ВО, 31

3 – Научно-исследовательский институт гриппа, 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.15/17

Тел.: +7(812)428-43-88; факс: +7(812)428-72-40; e-mail: n.kasyanenko@spbu.ru

Компактизация жёсткой и сильно заряженной молекулы ДНК в растворе лежит в основе создания генных векторов. Активно используемые на первом этапе вирусные системы доставки рекомбинантных ДНК в клетки-мишени имеют ряд существенных недостатков, среди которых – иммунный ответ со стороны организма. Среди альтернативных способов создания компактных структур, содержащих ДНК с необходимым генетическим материалом, выделяются так называемые полиплексы – интерполиэлектролитные комплексы ДНК с поликатионом. Они дешевы в изготовлении, устойчивы, с ними легко проводить компактизацию ДНК. В работе проводится сопоставление действия различных поликатионов в качестве конденсирующих агентов. Проводится сравнение компактизации ДНК, вызванной ее взаимодействием с рядом олигомеров, поверхностно активных веществ, точечных ионов[1,2]. Рассматриваются фазовые диаграммы для соответствующих систем.

Комплексная терапия при лечении различных заболеваний, связанных с повреждением молекулы ДНК, может быть основана на использовании генных векторов с различными включениями. Это могут быть противоопухолевые препараты, наночастицы и нанокластеры благородных металлов, обладающие уникальными оптическими свойствами, которые также можно использовать для медицинских целей. Наконец, включение люминесцирующих агентов в такие структуры наряду с наночастицами может привести к эффекту многократного усиления квантового выхода люминесценции.

Рассмотрение подобных структур проводится в работе.

Для сопряжения молекулы ДНК с наночастицами серебра проводили специальное исследование, которое показало, что наилучшего результата можно достичь либо восстановлением ионов серебра, связанных с ДНК, либо использованием поликатионов, сопряженных с наночастицами. При взаимодействии таких поликатионов с ДНК формируются компактные структуры, которые хорошо проникают в клетки-мишени. Предварительное связывание определенных соединений с ДНК позволяет сформировать компактные структуры на основе ДНК-полимерных комплексов, содержащие наночастицы и флуоресцирующие агенты. При определенных условиях можно сформировать на молекуле ДНК люминесцирующие нанокластеры серебра. Рассматриваются структуры, которые можно использовать для передачи микро РНК (siRNA) в клетки.

Работа частично поддержана грантами РФФИ (13-03-01192а) и СПбГУ (11.38.644.2013).

1. Kasyanenko, N., Lysyakova, L., et al., Biopolymers, 2015, vol. 103, no. 2, pp. 109-122.

2. Касьяненко, Н.А., и др., Высокомолекулярные соединения, 2012, т. А.2, сс. 1023-1035.

КОМПЛЕКСЫ МОЛЕКУЛЫ ДНК С АЦЕТАТОМ БИС(1,10-ФЕНАНТРОЛИН)-СЕРЕБРА(I) И МЕТАЛЛИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ СТРУКТУР**DNA complexes with acetate bis(1,10-phenanthroline)silver(I) and metallization of received structures****Касьяненко Н.А., Чжан Цюши, Осолодков М.И., Толстыко Е.А., Соколов П.А., Демидов В.Н.**

Физический факультет Санкт-Петербургского государственного университета Ульяновская ул. 1, Петродворец, 198504 Санкт-Петербург

Известно, что металлическое серебро проявляет бактерицидные и каталитические свойства, причем максимальный эффект достигается в том случае, когда серебро используется в виде коллоида, так как наночастицы серебра медленно освобождают ионы Ag^+ в раствор, не давая возможности активным компонентам среды быстро инактивировать бактерицидное действие серебра. Для пролонгации действия ионов серебра, защиты от быстрой инактивации и модификации их свойств используют также формирование комплексов серебра со сложными лигандами. Особое место занимают соединения с 1,10-фенантролиновыми лигандами и их производными, которые показывают антибактериальное, противовирусное и противоопухолевое действие. В ряде работ отмечается, что по отношению к ДНК 1,10-фенантролиновые комплексы металлов довольно часто ведут себя как интеркаляторы. Существуют данные, что 1,10-фенантролиновые комплексы $Cu(I)$ и $Cu(II)$ способны связываться с ДНК, проявлять противоопухолевые свойства и ингибировать вирусы иммунодефицита человека. Координационные соединения $Ag(I)$ с 1,10-фенантролинами изучены существенно меньше.

В наших исследованиях мы используем ацетат $[Ag(phen)_2]OAc \cdot H_2O$ (далее обозначаемый как Ag-Phen), содержащий стерически доступный для комплексообразования с ДНК незамещенный 1,10-фенантролин.

Целью проведенного исследования являлось сравнение взаимодействия высокомолекулярной ДНК с ионами серебра и соединением Ag-Phen в растворе, а также металлизация ДНК при добавлении восстановителя в раствор после образования соответствующих комплексов. Проведенное исследование имело две задачи: рассмотреть особенности комплексообразования молекулы ДНК с соединением Ag-Phen, проявляющим биологическую активность (предварительные данные показали его потенциальную цитостатическую активность) и провести восстановление серебра в комплексах ДНК-Ag-Phen, сравнив результат с восстановлением ионов серебра после образования их комплексов с молекулой ДНК. Использовали спектральные (круговой дихроизм, спектрофотометрия), гидродинамические (вискозиметрия и двойное лучепреломление в потоке) и микроскопические (АСМ и СЭМ) методы. Предложена молекулярная модель комплексообразования, рассмотрены результаты металлизации ДНК при восстановлении серебра после образования связей Ag^+ и Ag-Phen с ДНК. Обсуждается возможность использования полученных структур для решения различных задач в области нанобиотехнологий.

Работа частично поддержана грантами РФФИ (13-03-01192а) и СПбГУ (11.38.644.2013).

НАНОКОМПОЗИТНЫЕ НАНОПЛЕНОЧНЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ НАНОСИСТЕМЫ – ЛЕНГМЮРОВСКИЕ МОНОСЛОИ И МЕМБРАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ЛИПИДОВ, ПОЛИМЕРОВ И НАНОЧАСТИЦ

Nanocomposite nanofilm functional biomimetic nanosystems – Langmuir monolayers and membrane complexes based on lipids, polymers and nanoparticles

Ким В.П.1, Потапенков К.В.1, Кокшаров Ю.А.1, Усманов Н.Н.1, Салецкий А.М.1, Рахнянская А.А.2, Сыбачин А.В.2, Ярославов А.А.2, Файкин В.В.3, Тюкавин В.И.3, Таранов И.В.3, Черепенин В.А.3, Гуляев Ю.В.3, Хомутов Г.Б.1

1 – Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3

3 – Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, 125009, Москва, ул. Тел.: +7(916)697-26-14; e-mail: vp.kim@physics.msu.ru

Создание новых функциональных биосовместимых и биоактивных материалов и эффективных систем для инкапсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения различных веществ в водных средах, в том числе в живых системах, является в настоящее время актуальной задачей биофизики и ряда смежных областей, решение которой важно для практических био-медицинских применений. В данной работе нами получены и охарактеризованы новые нанокomпозитные биомиметические функциональные наносистемы на основе Ленгмюровских монослоев, пленок Ленгмюра-Блоджетт, а также везикулы и капсулы на основе мембранных комплексов, включающие липиды, функциональные аминокислотосодержащие амфифильные соединения, полимеры (в том числе биополимеры), неорганические наночастицы (Fe_3O_4 и Au). В качестве базового мембранообразующего биогенного липида использовался фосфатидилхолин. Аминосодержащие амфифильные соединения представляли собой вещества двух типов. Первое соединение – стеарилспермин, образованное молекулами стеариновой кислоты и природного полиамина спермина, соединенных пептидной связью. Молекулы стеарилспермина благодаря аминокислотным группам спермина обладают способностью протонироваться, приобретая положительный заряд, а также образовывать координационные связи с переходными металлами, в том числе связываться с наночастицами, содержащими такие металлы. Второе соединение – pH-чувствительный синтетический «липид» 4,5 дидодецилоксикарбонил-транс-2-морфолиноциклогексанол, молекулы которого претерпевают pH-индуцированный структурный переход при изменении pH среды от 7,4 до 5, обусловленный протонированием аминокислотной группы, входящей в состав молекулы этого соединения. Нами были получены Ленгмюровские монослои вышеуказанных аминокислотосодержащих амфифильных соединений, исследованы изменения изотерм сжатия таких монослоев при изменении состава водной субфазы и связывании ее компонентов (изменение величины pH и ионной силы, присутствие коллоидных наночастиц магнетита, молекул ДНК), а также получены и структурно охарактеризованы соответствующие пленки Ленгмюра-Блоджетт на поверхности слюды и аналогичные по составу нанокomпозитные липосомы. Полученные результаты указывают на возможность создания стабильных нанокomпозитных мембранных везикул и капсул на основе комплексов липидов, полимеров и наночастиц, структура и проницаемость оболочек которых может изменяться контролируемым образом определенными физическими и химическими воздействиями.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-12-01379).

ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ФИЦИНА И ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НА МАТРИЦАХ КИСЛОТОРАСТВОРИМЫХ ХИТОЗАНОВ**Heterogeneous biocatalysts based on ficin and trypsin immobilized on the matrix of acid-soluble chitosan**

Королева В.А., Логинова О.О., Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл. 1
e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

В последние два десятилетия значительно возрос интерес к изучению протеаз, полученных из растений. Растительные протеолитические ферменты широко используются в медицине: их применяют для лечения рака, пищеварительных и вирусных заболеваний. Хитозаны являются сополимерами 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и 2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и характеризуются высокой степенью адсорбции. Хитозаны обладают противогрибковыми и ранозаживляющими свойствами, нетоксичны, неиммуногенны и биоразлагаемы.

Цель работы заключалась в разработке методики получения гетерогенных биокатализаторов на основе протеаз, иммобилизованных на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов.

В качестве объектов исследования были выбраны фицин (Sigma) и трипсин (MP Biomedicals), субстратом для гидролиза являлись азоказеин (Sigma) и N-α-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид (BAPNA) (Sigma) соответственно, носителем для иммобилизации – кислоторастворимые среднемoleкулярный (Mr = 200 кДа, степень *деацетилирования* = 82 %) и высокомолекулярный хитозаны (Mr = 350кДа, степень *деацетилирования* = 94,85%) (ЗАО «Биопрогресс»). Для сорбции энзимов на матрицах кислоторастворимых хитозанов мы использовали следующие буферные системы: 0.05 М глициновый, 0.05 М трис-глициновый, 0.2 М ацетатный, 0.1 М фосфатный, 0.1 М цитратный, 0.05 М боратный буфер с добавлением KCl, 0.1 М боратный буфер без добавления KCl, 0.1 М карбонатный и 0.05 М трис-HCl буфер.

Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при иммобилизации фицина на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов при использовании глицинового буфера со значением pH 10.0 и 8.6 соответственно. При учете тех же критериев оптимальными для иммобилизации трипсина на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов оказались следующие буферные системы: цитратный со значением pH 5.0 и фосфатный в диапазоне pH 5.8-6.5.

Таким образом, мы считаем, что глициновый буфер со значением pH 10.0 и 8.6 перспективен для иммобилизации фицина на матрицах кислоторастворимых среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов соответственно; цитратный буфер со значением pH 5.0 и фосфатный буфер в диапазоне pH 5.8-6.5 перспективен для иммобилизации трипсина на матрицах обоих кислоторастворимых хитозанов.

Обсуждаются биофизические механизмы, лежащие в основе комплексования (иммобилизации) белковых макромолекул с функциональными группами хитозана.

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОКОМПЗИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИПИДОВ, ПОЛИМЕРОВ И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИХ ДИСТАНЦИОННАЯ АКТИВАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Biomimetic biocompatible nanocomposite microcapsules based on the complexes of lipids, polymers and magnetic nanoparticles and their remote activation by magnetic field

Кузнецов А.В.1, Потапенков К.В.1, Ким В.П.1, Кокшаров Ю.А.1, Сыбачин А.В.2, Ярославов А.А.2, Файкин В.В.3, Тюкавин В.И.3, Таранов И.В.3, Черепенин В.А.3, Гуляев Ю.В.3, Хомутов Г.Б.1

1 – Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3

3 – Институт радиотехники и электроники РАН, 125009, Москва, ул. Моховая 11, корп.7
Тел.: +7(980)514-50-93; e-mail: artemkuz67@gmail.com

Для современных и перспективных био-медицинских применений актуальны исследования в области создания новых биосовместимых магнитных наноконпозитных систем и эффективных средств управляемой доставки и высвобождения лекарственных и биологически-активных веществ в организме [1]. В данном сообщении представлены результаты работ по созданию и характеристике новых наноконпозитных коллоидных магнитных мембранных микрокапсул, и изучению влияния внешнего магнитного поля на их проницаемость. Основу микрокапсул составляют гетерогенные по составу липосомы, содержащие электронейтральные биогенные липиды и синтетические амфифильные молекулы, обеспечивающие связывание с липосомами полимеров и функциональных неорганических наночастиц. В данной работе использовались катионные липосомы на основе фосфатидилхолина, содержащие до 20% синтезированного нами катионного амфифильного аминокислотосодержащего соединения стеарилспермина, образованного молекулами стеариновой кислоты и природного полиамина спермина, соединенных пептидной связью. В качестве магнитных наночастиц использовались суперпарамагнитные безлигандные коллоидные наночастицы магнетита Fe_3O_4 со средним размером 5 нм, синтезированные нами с использованием метода Массарта [2] и стабилизированные за счет сил электростатического отталкивания. Связывание и образование поликонплексов наночастиц магнетита на поверхности липосом обусловлено образованием координационных связей между аминогруппами стеарилспермина и наночастицами магнетита. Полученные структуры исследовали методами просвечивающей электронной микроскопии, электронного магнитного резонанса, лазерного светорассеяния, электрофореза, кондуктометрии. Были получены суспензии модельных везикул и капсул, содержащих во внутреннем объеме раствор NaCl, и проведены эксперименты по изучению воздействия на такие системы внешнего магнитного поля. Нами был обнаружен эффект увеличения проницаемости синтезированных магнитных микрокапсул и эффективного выхода NaCl наружу под действием постоянного магнитного поля напряженностью 1,5 кЭ. Полученные результаты указывают на возможность создания стабильных наноконпозитных магнитных везикул и капсул на основе комплексов липидов, полимеров и магнитных наночастиц, проницаемость оболочек которых может изменяться контролируемым образом нетермическим воздействием внешнего магнитного поля.

Работа поддержана РФФ (грант 14-12-01379).

1. Giersig M., Khomutov G.B., (Editors.), *Nanomaterials for application in medicine and biology*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008, 188p.
2. Massart R., *IEEE Transactions on Magnetics*. 1981, V.17, P.1247–1248.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОГЛОЩЕНИЯ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Study of absorption features of microwave radiation by biological objects

Маречек С.В., Полников И.Г., Казаринов К.Д.

ФИРЭ им. В. А. Котельникова РАН, 141 190, Фрязино, Московская обл., ул. Введенского, 4;
Тел. +7(496)565-26-85, факс +7(495)702-95-72; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

В докладе представлены особенности поглощения биоматериалов в области микроволн и основные артефакты, которые могут встретиться на пути экспериментаторов, изучающих медико-биологические эффекты микроволнового излучения. Обоснованы методы измерения поглощенной мощности с помощью "радиовидения" и амплитудного детектирования поглощенной мощности (АДПМ).

Удельная поглощенная мощность (УПМ) в биологической ткани при микроволновом облучении определяется на основе уравнения теплопроводности в упрощенном виде с помощью измерения скорости изменения температуры тела. Это уравнение в условиях адиабатического приближения, показывает, что УПМ пропорциональна скорости изменения температуры в биологическом образце.

Для определения изменений температуры в объекте мы использовали метод температурного дистанционного зондирования биологической ткани (радиовидение), начало которого было положено при разработке СВЧ радиометрических измерений природной среды. Оценивая глубинную температуру на основании радиометрических данных до и в процессе микроволнового облучения, можно получить объективные данные о величине поглощенной мощности излучения в биологическом объекте [1].

В экспериментальной практике приходится сталкиваться с задачами спектроскопии и дозиметрии в биологических объектах сложной формы и в этих условиях, предложенный нами метод АДПМ, в котором сам объект является датчиком мощности, представляется очень удобным для корректного контроля величины и частотной зависимости поглощенной мощности микроволнового излучения.

При проведении экспериментальной работы с модельными клеточными системами в водных средах исследователей подстерегает возможность потери «полезного» сигнала на фоне вынужденной конвекции среды при поглощении микроволнового излучения. Особенно, это касается исследований «нетепловых» частотно селективных эффектов КВЧ излучения. Явление вынужденной конвекции было обнаружено нами при исследовании ряда мембранных модельных систем в водных средах в условиях микроволнового облучения: процессов перекисного окисления липидов, транспорта ионов кожей лягушки, бимолекулярной липидной мембраной и др. [2]. Учет этого явления или же его устранение помог бы исследователям уберечься от неизбежных ошибок в проведении эксперимента и заблуждений в интерпретации полученных результатов.

1. Казаринов К.Д., Маречек С.В., Полников И.Г. Вопросы измерения поглощенной мощности микроволнового излучения в биофизическом эксперименте / Электронная техника. Сер. 1. Техника СВЧ, 2015, Вып. 2 (525), с.59-70.
2. Казаринов К.Д. / Биологические эффекты КВЧ-излучения низкой интенсивности. Итоги науки и техники. Сер."Биофизика". М.: ВИНТИ, 1990, т. 27, 102 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ МЕТОДОМ ИНДУКЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА А

Investigation characteristics of algae by the method of chlorophyll *a* fluorescence induction .

Маторин Д.Н.1, Габбасова Д.Т.1, Братковская Л.Б.1, Алексеев А.А.2

1 – Биологический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

2 – Северо-Восточный федеральный университет им. М.К.Аммосова, г. Якутск

Тел.: +7(495)939-39-68; факс: +7(495)939-11-15; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Метод флуоресценции хлорофилла *a* используется для оценки обилия фитопланктона в различных океанологических работах [1]. На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ разработана и сертифицирована «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом» (ФР.1.39.2011.11246, ПНД Ф 14.2.268-2012) [2], а также разработан целый комплекс портативных приборов (сертифицированный флуориметр «МЕГА», погружной и проточный флуориметры) для регистрации характеристик фитопланктона [3].

Для оценки работы фотосинтетического аппарата водорослей перспективно использовать метод измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) [4]. Проведен анализ индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции микроводорослей в присутствии солей хрома и метилртути. Показано, что эти вещества ингибируют электронный транспорт на донорной части ФСII и увеличивают долю Q_v-невосстанавливающих центров. В результате этого наблюдается замедление скорости восстановления пигмента РЦ ФС1- P₇₀₀. Регистрация индукционных кривых была апробирована на природном фитопланктоне в отделяемых водоемах Белого моря. Предлагается использовать параметры индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции для раннего обнаружения появления токсических веществ в водной среде.

1. Matorin D.N. et al. / Oceanologia. 2004, V. 46, P. 519-531.
2. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. / М.: Альтрек. 2012. 131 с.
3. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. / М.–Ижевск: ИКИ-РХД. 2012, 256 с.
4. Antal T.K. et al. / Photosynthesis Research. 2009, V. 102, P. 67-76.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ НАХОЖДЕНИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА И ЭРГОСТЕРОЛА В КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ**Biological expediency of cholesterol and ergosterol in the cell membrane**

Михалева М.Г., Зленко Д.В., Стовбун С.В., Твердислов В.А.

ИХФ РАН, г. Москва, ул. Косыгина 4

тел.: (495) 939-7225, e-mail: wawe@bk.ru

Целью данной работы являлось экспериментальное и теоретическое (методами молекулярной динамики) исследование особенностей образования анизометрических структур в ксерогелях биологически важных хиральных молекул – холестерина и эргостерола.

В работе экспериментально показано, что в ксерогеле, полученном из раствора холестерина в метаноле формируются струны, а в ксерогеле раствора эргостерола при тех же условиях анизометрические структуры отсутствуют.

Методом молекулярной динамики построены Ван-дер-Ваальсовы модели структур молекул холестерина и эргостерола, определены их дипольные моменты и спектры длительностей жизни основного состояния хиральных доменов молекул, которые показали наличие домена, конформация которого меняется с высокой частотой в молекуле эргостерола.

Сделаны оценки времени вращательной релаксации молекул холестерина и эргостерола. Установлено, что комплементарное соответствие в парах возможно в случае, если время жизни в основном состоянии сопоставимо или больше времени вращательной релаксации молекулы.

Современное представление о роли холестерина и эргостерола в клеточных мембранах заключается в том, что они выполняют функции модификатора (пластификатора) бислоя. Однако, исходя из физико-геометрических особенностей мембран и соображений соразмерности, такая интерпретация роли молекул холестерина и эргостерола в составе клеточной плазматической мембраны вряд ли представляется очевидной.

Предложено альтернативное объяснение функциональной значимости холестерина, по-видимому, связанное с образованием коммутационных структур за пределами мембраны как биологической целесообразностью нахождения эргостерола в некоммутирующих клетках грибов и холестерина в коммутирующих клетках макроорганизмов.

НИЗКОРАЗМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ИЗ НЕНАСЫЩЕННЫХ ТРИГЛИЦЕРИДОВ И АММОНИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ: СТРУКТУРА И ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА

Low-dimensional systems of unsaturated triglycerides and ammonium compounds: structure and space-time dynamics

Михаловский И.С.1, Тарасевич В.А.2, Самойлов М.В.1, Мельникова Г.Б.3

1 – Белорусский государственный экономический университет (кафедра физикохимии материалов и производственных технологий), 220070, Минск, пр. Партизанский, 26, Республика Беларусь

2 – Институт химии новых материалов НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Ф.Скорины, 36, Республика Беларусь

3 – Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. П.Бровки, 15, Республика Беларусь

Тел.: +375(17)209-78-26; факс: +375(17)367-40-35; e-mail: jozef_m@tut.by

Разработка новых методов получения систем из биологических макромолекул необходима для создания технологий изготовления современных материалов для технических целей, медицины, сельского хозяйства. В работе приведены методологические основы получения высокодисперсных систем из ненасыщенных триглицеридов жирных кислот и аммониевых соединений, направленных на разработку технологий получения коллоидных форм препаратов для дезинфекции.

Молекулярные структуры из триглицеридов и аммониевых соединений получали с использованием ультразвуковой техники. Триглицериды вводили в водную среду и гомогенизировали с использованием роторной магнитной мешалки. Затем данную эмульсию обрабатывали ультразвуком с использованием установки ИЛ100-6/1 производства «Ультразвуковая техника – ИНЛАБ» (РФ). Частота ультразвуковых колебаний составляла 20 кГц. Мощность генератора – 700 Вт. Использовали волновод с коэффициентом передачи звуковой энергии в среду 1:1. Получали высоко дисперсную систему из триглицеридов [1]. Вводили водный раствор N,N-бисаминопропилдодециламина при интенсивном и равномерном перемешивании на роторной магнитной мешалке. Отношение весовых концентраций триглицериды: амин составляло 1:0,1.

С использованием спектрофлуориметрического комплекса СМ2203 «Солар» (РБ), работающего в режиме спектрофотометра исследовали агрегативную и седиментационную устойчивость липидных коллоидов на длине волны 700 нм (триглицериды и амины не поглощают данное излучение). Показано, что введение амина в дисперсную систему из триглицеридов не приводит к деструкции дисперсной фазы.

С использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) установлено, что на кремниевой подложке в сухом состоянии триглицеридные структуры с амином образуют сегменты, близкие к сферическим. Среднее значение высоты сегмент-подобных частиц составляет около 20 нм, диаметр – около 200 – 300 нм. Можно предположить, что в водной среде триглицериды с амином образуют глобулярные структуры.

Полученные результаты, с учетом высокой биоцидной активности аммониевых соединений, позволяют разработать новые дисперсные формы дезинфицирующих материалов определенного функционального назначения.

ВОЛОКНИСТЫЕ НАНОФИЛЬТРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ АЭРОЗОЛЕЙ И СУСПЕНЗИЙ**Fibrous nanofilters for analysis of biological aerosols and suspensions*****Михеев А.Ю., Морозов В.Н***

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино Московской обл. 142290

E-mail: 2miheev@gmail.com

В лаборатории наноструктур и нанотехнологий ИТЭБ РАН методом электроформования с нейтрализацией в газовой фазе разработаны уникальные нанофильтры из капрона-4,6. Нанофильтры представляют собой ультратонкие мембраны толщиной не более 1 мкм, изготовленные из волокон капрона со средним диаметром 15 нм.

При высокой эффективности фильтрования данные нанофильтры имеют низкую плотность 2-20 мг/м² и низкое сопротивление воздушному потоку, которое объясняется тем фактом, что волокна имеют малые числа Кнудсена и являются по сути макромолекулами. Данные фильтры превосходят по своим характеристикам фильтрующие материалы, описанные в литературе.

Продемонстрирована возможность применения нанофильтров в анализе биологических аэрозолей, таких как пыльца растений, и в анализе водных суспензий бактерий.

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИТНЫХ НАНОСТРУКТУР SiO₂-Ag НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ

The effect of SiO₂-Ag composite nanostructures on the respiration rate of mitochondria

Никельшпарг Э.И. 1, Браже Н.А. 1, Байжуманов А.А. 1, Деев Л.И. 1, Сарычева А.С. 2, Максимов Г.В. 1

1 –Биологический факультет МГУ, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

2 –Факультет наук о материалах МГУ, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, корп.Б

Тел.: +7(495)393-35-03; факс: +7(495)939-35-03; e-mail: evelinanick@gmail.com

В настоящее время возрастает интерес к конструированию высокочувствительных и селективных сенсоров на основе наноматериалов, обладающих плазмонным резонансом, для фундаментальных исследований и биомедицинских приложений, в частности для усиления сигнала комбинационного рассеяния света от биологических объектов. Важным этапом в разработке сенсоров является исследование влияния наноматериалов на биологический образец в течение времени, необходимого для проведения анализа. Мы провели исследование влияния композитных плазмонных наноматериалов, состоящих из сфер оксида кремния, покрытых наночастицами серебра (SiO₂-Ag), на целостность и дыхательную активность митохондрий сердечных мышц крысы. Используемые наноструктуры применяют для определения конформации цитохромов митохондрий методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Для измерения скорости потребления кислорода (дыхания) митохондриями использовали полярографический метод. Измерения проводили при комнатной температуре 25°C. Все растворы, кроме митохондрий, находились при комнатной температуре в равновесии с воздухом не менее 1 часа. Митохондрии после выделения хранили при температуре 4°C. Оценивали интенсивность дыхания митохондрий при различной активности дыхательной цепи по начальной скорости потребления кислорода: в состоянии 1 (по Чансу), т.е. в отсутствие субстратов; в состоянии 2, при добавлении субстратов дыхания: пирувата (конечная концентрация 2 мМ) и сукцината (конечная концентрация 5 мМ); в состоянии 3, при добавлении раствора АДФ (конечная концентрация 100 мкМ). Дыхательный контроль рассчитывали из соотношения скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 2. Для подтверждения целостности внутренней мембраны к суспензии митохондрий добавляли раствор протонофора СССР (конечная концентрация 1 мкМ), приводящего к разобщению электронного транспорта и синтеза АТФ. Внесение СССР приводило к ускорению потребления кислорода митохондриями, что свидетельствует об интактности внутренней мембраны. С помощью аналогичного теста мы исследовали, как используемые серебряные плазмонные наноструктуры SiO₂-Ag влияют на работу дыхательной цепи и интактность внутренней мембраны митохондрий в течение 5 минут, т.е. времени, которое необходимо для проведения измерений методом ГКР. Для этого мы инкубировали суспензию митохондрий на структурах SiO₂-Ag в течение 5 минут, после чего вносили инкубированную суспензию митохондрии в полярографическую ячейку и измеряли скорость потребления кислорода без субстратов дыхания; после внесения сукцината, пирувата и АДФ; а также после внесения протонофора СССР. Было показано, что скорость дыхания митохондрий после инкубации не отличалась от данных, полученных на митохондриях без предварительной инкубации на структурах SiO₂-Ag. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования плазмонных наноструктур SiO₂-Ag в качестве высокочувствительных и безопасных сенсоров для биомедицинских исследований.

ВОЗДЕЙСТВИЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА СВОЙСТВА БАКТЕРИОРОДОПСИНА. КР И ГКР СПЕКТРОСКОПИЯ БАКТЕРИОРОДОПСИНА И ЕГО МУТАНТА D96N**Influence of silver nanoparticles on the bacteriorhodopsin properties. Raman and SERS study of bacteriorhodopsin and D96N mutant*****Олейников В.А.1,2, Мочалов К.Е.1,2, Соловьева Д.О.1,2, Чистяков А.А., 1,2, Лукашев Е.П.,3, Набиев И.Р.,2,4***

1 – Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

2 – Московский Инженерно-Физический Институт (НИЯУ МИФИ), 115409 Москва,

3 – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва,

4 – Университет города Реймс, Шампань-Арден, 51100 Реймс, Франция

Тел.: +7(910)409-84-55; факс: +7(495)330-59-74; e-mail: voleinik@mail.ru

Методами оптической спектроскопии (поглощение, комбинационное рассеяние, КР и гигантское КР, ГКР, флеш-фотолиз) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследовано взаимодействие серебряных наночастиц (AgНЧ) с пурпурными мембранами (ПМ) из *Halobacterium salinarium*, содержащими светочувствительный белок бактериородопсин (БР) с хромофором ретиналем

Показано, что AgНЧ эффективно связываются с поверхностью ПМ, содержащих БР как дикого типа, так и его мутанта D96N. Обнаружено, что присутствие ПМ в значительной степени подавляет коагуляцию серебряного золя, необходимую для формирования ГКР-активных областей. Отношение содержания коагулированных AgНЧ в отсутствие и в присутствии ПМ составляет 1/15. Тем не менее, сигнал ГКР уверенно регистрируется. Малое содержание коагулированной формы БР, по-видимому, обуславливает малой усиление эффекта (фактор усиления ГКР составляет примерно 15).

Сравнение КР и ГКР спектров как для случая БР дикого типа, так для мутанта D96N, показало, что AgНЧ существенно изменяют свойства молекул бактериородопсина, локализованных в ГКР-активных областях. Воздействие AgНЧ подавляет фотоцикл БР, замораживая состояние ретиналя. В случае БР дикого типа, БР фиксируется наночастицами в основном состоянии, в случае мутанта D96N, в ГКР-активных областях увеличивается содержание депротонированной М-формы БР.

Вне ГКР активных областей, молекулы БР, сохраняют способность участвовать в фотоцикле. AgНЧ оказывают более слабое воздействие на свойства БР. Обнаружено, что AgNPs индуцируют процесс перехода белка в то состояние, в котором белок преимущественно фиксируется в ГКР активных областях. В случае БР дикого типа, наночастицами индуцируется и ускоряется переход в основное состояние. Для мутанта D96N наблюдается обратный эффект. Наночастицы AgNPs в ГКР-активных областях фиксируют БР преимущественно в М-форме. Соответственно, адсорбция AgNPs на поверхности ПМ индуцирует замедление процесса распада М-формы.

Таким образом, эффект подавления фотоцикла определяется параметрами связывания на наноразмерном уровне и варьируется от незначительного изменения параметров фотоцикла при слабом взаимодействии AgNPs с хромофором белка (вне ГКР активных областей) до полного замораживания состояния ретиналя в ГКР активных областях.

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ: проекты 13-04-00168 и 15-29-01193

НОВЫЕ/СТАРЫЕ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКЕ: КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ, SNOM, SERS, TERS

Modern/ancient instrumental techniques in biology and biophysics: correlative microscopy, SNOM, SERS, TERS

Олейников В.А.1,2, Мочалов К.Е.1,2

1 –Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва

2 –Московский Инженерно-Физический Институт (НИЯУ МИФИ), 115409 Москва

Тел.: +7(910)409-84-55; факс: +7(495)330-59-74; e-mail: voleinik@mail.ru

Термин корреляционная микроскопия появился в середине прошлого века и под ним понимали комбинацию методов электронной и оптической микроскопии. К настоящему времени диапазон микроскопических методов существенно расширился и понятие корреляционной микроскопии включает: (1) получение структурной информации методами микроскопии высокого разрешения; (2) получение данных о составе и функциональных свойствах методами оптической микроспектроскопии; и, реконструкция трехмерной структуры (томография).

Проблемы корреляционной микроскопии связаны главным образом с возможностью и точностью совмещения данных, получаемых методами с существенно разным пространственным разрешением (доли нм для электронной и сканирующей зондовой микроскопии и сотни нм при использовании оптических методов). В настоящей работе рассмотрены подходы преодоления проблем корреляционной микроскопии, в частности, путем использования микроскопии ближнего поля (Scanning Near-Field Optical Microscopy, SNOM). Описан оригинальный подход, развиваемый авторами, основанный на объединении методов оптической поляризационной микроспектроскопии, атомно-силовой микроскопии и механической микротомографии. Возможности подхода продемонстрированы на примере установления корреляций между флуоресцентными поляризационными свойствами жидкокристаллической среды, содержащей полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) и особенностями 3-D распределения нанокристаллов в жидкокристаллической матрице. Продемонстрированы возможности микроскопии ближнего поля. В частности показана возможность получения оптической информации с разрешением, сопоставимым с разрешением атомно-силового микроскопа. Рассмотрены методы получения оптических изображений с разрешением, превышающим дифракционный предел и записи 3-D изображений с использованием фотостабильных флуорофоров (полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы).

Подход, основанный на использовании микроскопии ближнего поля, стал основой развития методов спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) с пространственным разрешением и, в частности гигантского КР (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) и КР, усиленный на острие (Tip Enhanced Raman Scattering, TERS).

В настоящей работе рассмотрены как методы возбуждения/сбора излучения в локальных TERS-активных областях, так и способы формирования игл для TERS. Представлены известные применения TERS в исследованиях биологических объектов. Анализируются пути совмещения методов TERS, SERS и SNOM с другими методами корреляционной микроскопии, рассматриваются современные возможности корреляционной микроскопии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

РОЛЬ ПРОЦЕССА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ

The role of lipid peroxidation on the cytotoxicity of nanoparticles

Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б.

1- Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 24, Россия

2-ИТЭБ РАН, 142290, Пущино, Московская область, ул. Институтская, 3, Россия

Тел.: +7(905)730-24-21; e-mail: pirutin@yandex.ru

Изучена цитотоксичность двух видов наночастиц, гидроксированного фуллерена $C_{60}(OH)_{25}$ и наночастиц серебра препарата «Повиаргола». Работа проведена с использованием микрофлуориметрического метода анализа животной клетки. Мишенью воздействия наночастиц были мембраны перитонеальных мышинных макрофагов.

В работе проверялась гипотеза механизма цитотоксичности наночастиц, указывающая на основную роль в этом процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ).

При инкубации клеток с наночастицами фуллерена $C_{60}(OH)_{25}$ повышение температуры среды (от 22°C до 37°C) интенсифицирует ПОЛ и приводит к более выраженному повреждению мембран перитонеальных макрофагов. Увеличение концентрации частиц в среде инкубации клеток также приводит к увеличению повреждения последних. В условиях H_2O_2 – индуцированного повреждения мембран фуллерен в концентрации 0,05 мг/мл повышает эффективность повреждающего действия H_2O_2 , а в концентрации 0,5 мг/мл снижает ее. При УФ – индуцированном повреждении клеточных мембран мембранотропное действие излучения возрастает при предварительном добавлении наночастиц $C_{60}(OH)_{25}$ в среду инкубации и снижается при добавлении их после окончания облучения.

Повреждающее действие наночастиц серебра препарата носит концентрационно зависимый характер. Снижение температуры инкубации от 30 до 4°C приводит к усилению мембранотропного эффекта препарата. Однако, в интервале от 37 до 30°C наблюдается обратная зависимость. Повреждающее действие «Повиаргола» усиливается при повышении pH среды инкубации до 8,4, а также при возрастании концентрации ионов кальция в среде до 8 ммоль/л. Эффект повреждения снижается при уменьшении pH среды до 6,3, а также при действии радиопротектора серотонина.

В работе обсуждается участие АФК (активных форм кислорода), связанных с присутствием в среде инкубации клеток наночастиц которое приводит к инициации процесса ПОЛ и связанному с ним повреждению мембран макрофагов.

1. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в биологии и медицине: проблемы и перспективы // Фундаментальные направления молекулярной медицины. СПб.: Росток, 2005. С. 195–268.
2. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Ефремов Ю.М., Шайтан К.В., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б. Повреждающее действие препарата «повиаргол» на плазматические мембраны перитонеальных макрофагов мышей // Радиационная биология. Радиоэкология, 2012, том 52, № 1, с. 66–70
3. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кедров А.В., Кудряшов Ю.Б., Шайтан К.В., Рубин А.Б. Влияние гидроксированного фуллерена $C_{60}(OH)_{25}$ на целостность плазматических мембран макрофагов // Радиационная биология. Радиоэкология, 2012, том 52, № 3, с. 252–256

КОНТРОЛЬ СИЛЬНОПОГЛОЩАЮЩИХ ЖИДКОСТЕЙ В МИКРОВОЛНОВОМ ДИАПАЗОНЕ ЭМИ С ПОМОЩЬЮ ВОЛНОВОДНО ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Control of strongly absorbing liquids in the microwave band by dielectric waveguide technique

Полников И.Г.1, Городецкая М.В.2, Казаринов К.Д.1

1 – ФИРЭ им. В.А.Котельникова РАН, 141 190, Фрязино, Моск. обл. ул. Введенского, 4;

2 – ФГУП СКБ ИРЭ РАН, 141 190, Фрязино, Моск. обл. ул. Введенского, 4

Тел. +7(496)565-26-85, факс +7(495)702-95-72; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Опыт показывает, что традиционные резонаторы, недостаточно привлекательны для исследования жидких диэлектриков с большими потерями, вследствие значительного возмущения поля. Эта проблема была решена при использовании колебаний основного типа, что позволило анализировать образцы значительно большего диаметра и с большими потерями при отсутствии возмущения поля. Возможность перестройки цилиндрического резонатора с помощью подвижного поршня можно отнести к основным достоинствам режима основного типа колебаний. Использование перестраиваемого резонатора существенно расширяет возможности метода для анализа жидких диэлектриков и повышает его чувствительность.

В наших экспериментах по изучению первичных механизмов биологического действия микроволнового излучения приходилось искать такой способ облучения, при котором весь объект находился бы в поле излучения и в то же время можно было бы контролировать его состояние. Таким образом, мы пришли к необходимости воспользоваться тонким полиэтиленовым капилляром, заполненным для целей наших исследований суспензией липосом.

Следует отметить, что подобный способ облучения в капилляре, пропущенным сквозь широкую стенку волновода, обеспечивает хорошее согласование биологического объекта с волноводным измерительным трактом. К тому же, при определенном соотношении между размерами волновода, диаметром и толщиной стенок капилляра, диэлектрическими параметрами биологического материала, заполняющего капилляр и длиной волны микроволнового излучения в тракте возможно значительное увеличение поглощенной мощности в довольно узкой полосе частот (волноводно - диэлектрический резонанс). Было обнаружено, что капилляр с суспензией липосом поглощает микроволновое излучение гораздо сильнее, чем с суспензией эритроцитов, и еще более интенсивно, чем капилляр с дистиллированной водой. Можно предположить, что после включения микроволновой мощности суспензия липосом нагревается, а излом на зависимости поглощения сигнала от мощности в случае капилляров с ДПЛ связан с термотропным структурным переходом гель-жидкий кристалл, т.е. с плавлением мембран при температуре фазового перехода.

Полученные экспериментальные результаты позволяют судить о фазовых переходах в биологических мембранах при воздействии микроволнового облучения низкой интенсивности, как о возможном механизме восприимчивости биообъектов к данному виду излучения. Кроме того, была обнаружена возможность регистрации структурных фазовых переходов в липосомах – моделях биологических мембран по изменению величины поглощения микроволнового сигнала в капиллярной диэлектрической трубке.

1. Казаринов К.Д., Полников И.Г., Городецкая М.В. Использование волноводно диэлектрического метода для контроля и исследований сильнопоглощающих жидкостей в микроволновом диапазоне // Электронная техника. Сер. 1. СВЧ-техника. 2014. № 1 (520). С. 82-94.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ КАК СИСТЕМА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ**Polyelectrolyte microcapsules as a system for intracellular delivery of cerium oxide nanoparticles*****Попов А.Л.1,2, Сухоруков Г.Б.1,2, Попова Н.Р.2***

1 – Лондонский университет Королевы Марии, E14 NS Лондон, Великобритания

2 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская область, Пущино, Институтская 3

Тел. +7(495) 632-78-69 Факс: +7(4967) 33-05-53 e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Наночастицы диоксида церия (наноцерий) рассматривается как один из наиболее перспективных наноматериалов для биомедицинского применения. Ранее показано, что наноцерий является эффективным антиоксидантом, обладающим высокой биосовместимостью и низкой токсичностью. Наноцерий проявляют гено, радио, кардио, гепатопротекторные свойства, являются миметиками внутриклеточных ферментов и способны модулировать экспрессию целого ряда генов. При этом ультрамалые размеры и высокая реакционная способность осложняют возможность контролируемой целевой доставки наночастиц в клетки и ткани. Целью данного исследования была разработка систем доставки наноцерия в структуре полиэлектrolитных микрокапсул и комплексная анализ их физико-химических характеристик и цитотоксичности.

Был проведен синтез шестислойных полиэлектrolитных микрокапсул из биodeградируемых (полиаргининин (15-70кДа) и декстран сульфат (40кДа)) и синтетических (полистиролсульфонат (70кДа) и полиаллиламин (58кДа)) полиэлектrolитов, в третий слой которых был включен цитратный наноцерий (размер 2-5 нм, дзета-потенциал – 40мэВ). Результаты ТЭМ, СЭМ и EDX анализа микрокапсул подтверждают наличие наноцерия в оболочке микрокапсул. Размер микрокапсул из синтетических полиэлектrolитов варьируется от 3-4 мкм и 2-3 мкм для микрокапсул из биodeградируемых полиэлектrolитов. Микрофотографии ТЭМ анализа позволяют выявить кристаллическую решетку наноцерия в структуре микрокапсул. Конфокальная микроскопия подтвердила большую степень флуоресценции синтетических микрокапсул, нежели из микрокапсул из биodeградируемых полиэлектrolитов, что, по всей видимости, связано со степенью заряженности синтетических полимеров и большой адсорбцией наноцерия в оболочку микрокапсулы. Было проведено комплексное исследование цитотоксичности синтезированных микрокапсул на культуре клеток нейробластомы человека В50. Полученные результаты МТТ теста на трех сроках инкубации (24, 48 и 72 часа), а также оценка с использование набора LIVE/DEAD (Invitrogen) подтверждают отсутствие токсичности в концентрациях 1 и 10 микрокапсул на клетку для обоих типов капсул. Поглощение микрокапсул клетками В50 происходит в течение 1-2 часов. Биodeградируемые микрокапсулы разрушаются в цитоплазме в течение 6 часов и выбрасывают наноцерий. Микрокапсулы из синтетических полимеров сохраняют свою структуру в клетке в течение нескольких дней без деградации.

Полиэлектrolитную микрокапсулу, можно рассматривать как высокоэффективную систему доставки наночастиц, обладающих не только терапевтическим, но и сильным цитотоксическим действием. Данная система позволяет контролировать дозу и концентрацию вводимого препарата, время деградации за счет варьирования массы полиэлектrolитов и методики синтеза микрокапсул, а также дает возможность ее функционализировать различными лигандами, пептидами, антителами, придав более селективную направленность их доставки.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 14-04-32199 и № 14-44-03615

БИОМИМЕТИЧЕСКИЕ БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОКОМПЗИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИПИДОВ, ПОЛИМЕРОВ И ПРОВОДЯЩИХ НАНОЧАСТИЦ И ИХ ДИСТАНЦИОННАЯ АКТИВАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИМПУЛЬСНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Biomimetic biocompatible nanocomposite microcapsules based on the complexes of lipids, polymers and conductive nanoparticles and their remote activation under pulsed electric field

Потапенков К.В.1, Ким В.П.1, Кокшаров Ю.А.1, Сыбачин А.В.2, Ярославов А.А.2, Файкин В.В.3, Тюкавин В.И.3, Таранов И.В.3, Черепенин В.А.3, Гуляев Ю.В.3, Хомутов Г.Б.1

1 – Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 2

2 – Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3

3 – Институт радиотехники и электроники РАН, 125009, Москва, ул. Моховая 11, корп.7
Тел.: +7(495)939-30-25; e-mail: metalsonic@inbox.ru

Среди актуальных задач биофизики и ряда смежных областей науки важное место занимает проблема создания новых функциональных биосовместимых и биоактивных материалов и эффективных систем для капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения различных лекарственных и биологически-активных веществ в водных средах, в том числе в живых организмах. В данном сообщении представлены результаты работ по созданию и характеристике новых наноконпозитных коллоидных мембранных везикул и микрокапсул, и изучению влияния импульсов электрического поля на их проницаемость. Основу таких везикул и капсул составляют липосомы, содержащие электронейтральные биогенные липиды (фосфатидилхолин) и специальные аминокислотосодержащие катионные амфифильные молекулы (стеарилспермин), обеспечивающие связывание с липосомами полианионов и функциональных неорганических наночастиц. Наноконпозитные везикулы формировали путем последовательной адсорбции на предварительно полученные стандартным ультразвуковым методом смешанные по составу липосомы (фосфатидилхолин и до 20% стеарилспермина) коллоидных неорганических наночастиц магнетита Fe_3O_4 или золота со средним размером 5 нм, а также слоя полианиона (полистиролсульфонат, ДНК). Полученные структуры исследовали методами просвечивающей электронной микроскопии, электронного магнитного резонанса, лазерного светорассеяния, электрофореза, кондуктометрии и др. Были получены суспензии модельных наноконпозитных капсул, содержащих во внутреннем объеме раствор NaCl, и проведены эксперименты по изучению воздействия на такие системы электромагнитных импульсов высокой напряженности. Нами был обнаружен эффект увеличения проницаемости синтезированных микрокапсул и эффективного выхода NaCl наружу под действием сверхкоротких (длительность ~ 5 нс) импульсов электрического поля напряженностью $15 \cdot 10^6$ В/м. Предложена теоретическая модель, описывающая механизм взаимодействия наноконпозитных липосом, содержащих на поверхности проводящие наночастицы, с внешним электрическим полем, которое приводит к существенному изменению структуры липосомы. Получены оценки критических значений внешнего электрического поля, приводящего к декапсуляции наноконпозитных липосом. Полученные результаты указывают на возможность создания наноконпозитных мембранных капсул на основе комплексов липидов, полимеров и наночастиц, структура и проницаемость оболочек которых может изменяться контролируемым образом с помощью нетеплового импульсного электрического воздействия. Такие наносистемы могут являться основой для создания новых эффективных средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения различных веществ в водных средах, перспективных для био-медицинских и других применений.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант 14-12-01379)

СОЗДАНИЕ МНОГОРАЗОВОЙ СИСТЕМЫ БИОХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ НА ОСНОВЕ НАНОАЛМАЗОВ**Creating a nanodiamond-based reusable system for biochemical determination of urea****Ронжин Н.О.1, Барон А.В.1,2, Бондарь В.С.1,2**

1 – Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, Академгородок, 50, стр.50

2 – Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Тел.: +7(391)249-42-40; факс: +7(391)243-34-00; e-mail: roniol@mail.ru

Физико-химические свойства детонационных нанодIAMAZOV открывают широкие возможности их применения в биомедицинских целях [1-3]. Одним из перспективных направлений использования данных наночастиц является создание на их основе новых эффективных средств индикации и диагностики, включая системы многоразового действия. Для этих целей интерес представляют модифицированные нанодIAMAZOV (МНА), образующие в дисперсионных средах высокостабильные коллоиды [4,5]. В работе показана применимость МНА для конструирования многоразовой системы биохимического определения мочевины.

Исследования проведены с использованием МНА марки RUDDM 0-125 ($d_{50} = 49.6$ нм), производимые ООО «Реал-Дзержинск» (Россия) известным способом [6]. Для экспериментов применяли гидрозоль с концентрацией МНА 10.0 г/л. Конструирование диагностической системы осуществляли посредством ковалентной пришивки фермента (уреаза) на поверхность частиц МНА, предварительно активированную бензохиноном по известной методике [7,8], позволяющей проводить иммобилизацию белков на активированном носителе в относительно мягких условиях. Функциональную активность сконструированной системы (комплекс МНА-уреаза) оценивали салицилат-гипохлоритным методом по образованию при тестировании мочевины окрашенного продукта реакции (максимум поглощения при длине волны 700 нм).

Установлено, что ковалентно иммобилизованная на поверхности МНА уреаза проявляет свою каталитическую функцию и осуществляет гидролиз мочевины с образованием аммиака – последующая добавка в реакционную смесь необходимых химических реагентов сопровождается образованием окрашенного продукта. Экспериментально показано, что комплекс МНА-уреаза может функционировать в деионизованной воде, различных буферных системах, широком интервале температур и pH. Сконструированная диагностическая система обеспечивает линейный выход продукта в диапазоне низких концентраций (1-30 мкг/мл) мочевины, позволяет проводить многократное тестирование аналита *in vitro*. Полученные результаты имеют важное практическое значение и позволяют прогнозировать возможность применения созданной тест-системы для целей клинической диагностики.

Работа поддержана Президиумом РАН (программа № 1.1, проект 1.1.8).

1. Schrand A., Hens S.A.C. et al. / Crit. Rev. Solid State Mater. Sci., 2009. V.34. P.18-74.
2. Say J.M., van Vreden C. et al. / Biophys. Rev., 2011. V.3. P.171-184.
3. Mochalin V.N., Shenderova O. et al. / Nature Nanotech., 2012. V.7. P.11-23.
4. Bondar V.S., Puzyr A.P. / Phys. Solid State, 2004. V.46. P.716-719.
5. Gibson N., Shenderova O. et al. / Diam. Relat. Mater., 2009. V.18. P.620-626.
6. Пузырь А.П., Бондарь В.С. / Патент РФ № 2252192, Опубл. 20.05.2005 Бюл. №14.
7. Brandt J., Andersson L.O. et al. / Biochim. Biophys. Acta, 1975. V.386. P.196-202.
8. Mateescu M.-A., Weltrowska G. et al. / Biotechnol. Tech., 1989. V.3. P.415-420.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ФуЛЛЕРЕНОЛОВ. БиОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ

Antioxidant activity of fullerenols. Bioluminescent monitoring

Сачкова А.С., 1,2 Ковель Е.С., 3,2 Чурилов Г.Н., 4 Кудряшева Н.С. 2,3

1 – Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30, as421@yandex.ru

2 – Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, ул. Академгородок 50/50

3 – Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

4 – Институт физики СО РАН, 660036, Красноярск, ул. Академгородок 50/38

Фуллеренолы – водорастворимые полигидроксилированные фуллерены, одни из наиболее перспективных наноматериалов. На основе данных соединений создаются препараты для медицины и фармакологии, они могут входить в состав антибактериальных, противогрибковых и противовирусных средств. Выявление антиоксидантной активности фуллеренолов широко исследуется по всему миру. В данной работе на примере растворов модельных окислителей (органического – 1,4-бензохинона и неорганического – феррицианида калия) продемонстрирована применимость биоломинесцентных тестовых систем (лиофилизированных бактерий *P.phosphoreum* и биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза–люцифераза) для оценки изменений общей и окислительной токсичности при воздействии фуллеренола в качестве антиоксидантного агента. Использовали препарат фуллеренола $C_{60}O_{2-4}(OH)_{20-24}$ и смесь фуллеренолов $C_{60}O_{2-4}(OH)_{20-24} + C_{70}O_{2-4}(OH)_{20-24}$. Фуллеренолы были синтезированы и гидроксильированы в лаборатории аналитических методов исследования вещества Института Физики им. Л. В. Киренского СО РАН (Красноярск, Россия). Изменение общей и окислительной токсичности растворов окислителей под действием фуллеренолов оценивали с помощью коэффициентов детоксикации. В экспериментах использовали рабочие концентрации фуллеренолов, не влияющие на интенсивность биоломинесценции тестовых систем ($< 10^{-4}$ г/л). Экспериментальные данные показали, что коэффициенты детоксикации фуллеренолами, рассчитанные по изменению общей токсичности при использовании лиофилизированных бактерий, для органического окислителя выше, чем для неорганического. Данное различие может быть связано с эффективностью транс-мембранных процессов у светящихся бактерий. Возможно, комбинация амфифильных соединений (1,4-бензохинон + Фуллеренол) в водных растворах в большей степени способствует интенсификации мембранных и последующих внутриклеточных процессов, лежащих в основе защитной реакции бактерий. Схожие результаты были получены при использовании биферментной системы. Коэффициенты детоксикации фуллеренолами, рассчитанные по изменению как общей, так и окислительной токсичности, в растворах органического окислителя также оказались выше, чем неорганического. На основе анализа скоростей реакций биферментной системы в отсутствие и присутствии фуллеренолов показано, что фуллеренолы (10^{-8} г/л) ускоряют ферментативные НАДН-зависимые реакции, тем самым стимулируя защитную реакцию биоломинесцентной ферментативной системы, и/или (2) ускоряют автоокисление НАДН, уменьшая восстановительную способность среды, что приводит к подавлению биоломинесцентной функции тестовой системы. Наши результаты показали, что обе биоломинесцентные тестовые системы (бактериальная и ферментативная) демонстрируют схожий детоксицирующий эффект фуллеренолов. Детоксицирующие концентрации фуллеренолов малы: 10^{-17} - 10^{-4} г/л. Детоксикация растворов 1,4-бензохинона (амфифильного соединения), более эффективна, чем – феррицианида калия (ионного соединения).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ НА АКТИВНОСТЬ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ НЕЙТРОФИЛОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***Investigation of the effect of gold nanoparticles on the activity of polymorphonuclear neutrophils under *in vitro* conditions****Соловьева Э.Ю.1, Чеканов А.В.,1 Баранова О.А.1, Бабушкин А. В.1, Мудров В. П.1, Федин А.И.1, Казаринов К. Д.2**

1 – ГОУ ВПО РНИМУ им. Пирогова Минздравсоцразвития, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

2 – ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН, 141 190, Фрязино, Моск. обл., ул. Введенского, 4

Тел. +7(496)565-26-85, факс +7(495)702-95-72; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Золотые наночастицы (НЧ) являются объектом интенсивного изучения для практического использования в биомедицинских целях. Они находят применение для идентификации химических и биологических агентов, в качестве средства доставки лекарственных препаратов, ДНК, антигенов, в медицинской диагностике, фототермической и фотодинамической терапии, а также в качестве носителей или «контейнеров» целевых молекул. При этом возникают обоснованные опасения по поводу их возможной токсичности и способности вызывать мутации. В ходе наших исследований было показано, что золотые наночастицы, изменяя поверхностную плотность зарядов на мембранах нейтрофилов и, тем самым, меняя поверхностный мембранный потенциал, вызывают активацию форменных элементов крови, которая сопровождается образованием свободнорадикальных продуктов перекисного окисления и вспышкой хемилюминесценции (ХЛ). Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаруживаемое свечение связано с активацией клеток, сопровождающееся выбросом содержимого из азурофильных гранул, что приводит к процессам образования активных форм кислорода, окислению люминола, которые и сопровождаются интенсивной вспышкой ХЛ. В основе механизма активации, как показали результаты наших экспериментов, лежит влияние частиц золота на поверхностный мембранный потенциал нейтрофилов. Исследование изменения интенсивности флуоресценции отрицательно заряженного зонда АНС на поверхности модельных мембран при добавлении различных концентраций золотых наночастиц свидетельствует об изменении плотности зарядов на мембранной поверхности, что может являться причиной активации ионных каналов в мембранах и притока ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимые каналы в цитоплазму клетки. Регистрируемое в наших экспериментах снижение свечения ХЛ при добавлении золотых частиц более 0.043×10^{-11} М происходит, вероятно, из-за инактивации Ca^{2+} -каналов, которая возникает в результате повышения внутриклеточного Ca^{2+} до определенного критического уровня. При добавлении золотых наночастиц диаметром 30 и 60 нм в плазму крови, регистрировалось образование агрегатов, состоящих не только из тромбоцитов, но и других клеточных элементов и компонентов плазмы. Причем, в случае добавления в пробу золотых частиц диаметром 60 нм, диаметр агрегатов составлял 9,5-12,8 мкм. Добавление же золотых наночастиц диаметром 30 нм приводило к образованию агрегатов размером 30,8–32 мкм. Известно, что НЧ золота связывают белки через SH-группы цистеина. Выявлено незначительное влияние НЧ золота диаметром 30 и 60 нм на показатели плазменного гемостаза. Высказываются предположения об отсутствии заметной зависимости между размером, концентрацией наночастиц и типом белков, которые они способны сорбировать на своей поверхности. Авторы данной работы надеются, что полученные результаты могут быть использованы для выявления ранних биомаркеров начала развития нейроповреждений, как растворимых в плазме крови, так и присутствующих на клеточной поверхности.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИКОАГУЛЯНТНЫМИ И ТРОМБОЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Assessing the possibility of the use of silver nanoparticles for the regulation of the hemostatic system and the creation of a drug having thrombolytic properties and antikoagulatorynymi

Соловьева Э.Ю.1, Чеканов А.В.1, Баранова О.А.1, Бабушкин А. В.1, Мудров В. П.1, Федин А.И.1, Казаринов К. Д.2

1 – ГОУ ВПО РНИМУ им. Пирогова Минздравсоцразвития, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

2 – ФИРЭ им.В.А.Котельникова РАН, 141 190, Фрязино, Моск. обл., ул. Введенского, 4;

Тел. +7(496)565-26-85, факс +7(495)702-95-72; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

В настоящее время в литературе накопилось достаточно много противоречивых сведений касающихся способности наночастиц серебра предотвращать активацию тромбоцитов в ответ на действие физиологических агонистов, а также влиять на процесс полимеризации фибрина и замедления образования тромба. Мы предприняли попытку прояснить этот вопрос. Для этого условия экспериментов были максимально приближены к условиям *in vivo*.

Цель исследования состояла в изучении влияния двух групп наночастиц серебра диаметром 10, 20, 25 и 68, 70 нм на систему клеточного и плазменного гемостаза *in vivo*. Для изучения агрегации тромбоцитов был использован метод растровой электронной микроскопии. Наночастицы серебра были предварительно проинкубированы с богатой тромбоцитами плазмой крови человека в присутствии АДФ. В контроле диаметр агрегатов не превышал 2,9 – 3,2 мкм. Добавление 60 мкМ наночастиц диаметром 68 или 70 нм в плазму, обогащенную тромбоцитами, вызывало образование агрегатов диаметром 3,5-4,2 мкм, пронизанных сеткой фибрина, что свидетельствовало об усилении агрегации.

При добавлении в плазму частиц диаметром 10 и 20, 25 нм проявлялся антиагрегационный эффект – образовывались агрегаты диаметром 1,8 – 2,5 мкм. Добавление наночастиц серебра этой группы в концентрации от (10 до 100 мкМ) препятствовало полимеризации фибрина. Однако полное подавление полимеризации фибрина не было достигнуто ни при одной из концентраций наночастиц.

В плазме крови замедление полимеризации фибрина и образование сшивок было менее выражено, чем в модельной системе, что возможно связано с неспецифическим взаимодействием наночастиц с другими белками плазмы (альбумином и глобулином). Методом хемилюминесценции удалось зарегистрировать сверхслабое свечение, сопровождающее активацию нейтрофилов крови в присутствии люминола при добавлении наночастиц серебра. Добавление наночастиц сопровождалось интенсивной вспышкой хемилюминесценции. Изучение влияния наночастиц в различных концентрациях на плазменные показатели гемостаза не выявило изменения протромбинового времени и АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время). При добавлении частиц размером 10 и 20, 25 нм АЧТВ не уменьшалось в пределах нормативных значений, а протромбиновое время не снижалось. В случае частиц 67-70 нм также не наблюдалось уменьшение протромбинового времени и АЧТВ.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке антикоагулянта на основе наночастиц серебра для применения в клинической практике.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА КОНЪЮГАТОВ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ С БЕЛКАМИ

Fluorometric technique for determination of the composition of (gold nanoparticles – proteins) conjugates

Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33
Тел.: +7(495)954-28-04; факс: +7(495)954-28-04; e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

Благодаря своим уникальным физическим и химическим свойствам наночастицы золота нашли широкое применение в различных областях биохимии, медицины, аналитической химии и др. В подавляющем большинстве случаев для использования их подвергают модификациям. Получение таких комплексов наночастиц обусловило потребность в разработке методов характеристики их состава и функциональных свойств. Несмотря на интенсивное развитие данной области знаний в течение нескольких десятилетий, представления о взаимодействии белков с золотыми наночастицами остаются противоречивыми. Результаты, получаемые с помощью различных методов, значительно отличаются друг от друга и служат основанием для принципиально разных интерпретаций состава и свойств получаемых конъюгатов – например, для заключений о моно- либо полислойной иммобилизации белков на поверхности наночастиц.

Предлагаемый метод определения состава конъюгатов золотых наночастиц с белками основан на регистрации флуоресценции триптофана. В отличие от известных разработок, основанных на тушении данной флуоресценции на поверхности наночастиц и не учитывающих отличия разных вариантов иммобилизации, а также нелинейность наблюдаемых эффектов, в предлагаемом методе измеряется остаточная флуоресценция реакционного раствора после отделения от наночастиц центрифугированием. Такой подход исключает влияние наночастиц на флуоресценцию белка и обеспечивает высокую точность при определении количества несвязанного белка. Метод был использован для определения состава конъюгатов коллоидного золота со средним диаметром 24 нм, полученного цитратным методом, с 4-мя белками: человеческим иммуноглобулином G (IgG), бычьим сывороточным альбумином (BSA), рекомбинантным стрептококковым белком G (PG) и соевым ингибитором трипсина (STI). Полученные зависимости состава конъюгатов от концентрации добавленного при pH 5.4 белка во всех случаях представляют собой кривые с насыщением. Равновесные константы диссоциации комплексов наночастиц с IgG, BSA, PG, STI на начальном участке концентрационной зависимости составляют 4, 6, 10, 15 нМ, а при приближении к насыщению: 25, 76, 175, 100 нМ соответственно. Максимальная связывающая емкость одной наночастицы для IgG, BSA, PG, STI составляет 52, 90, 500, 550 соответственно, что хорошо согласуется с гипотезой о монослойной иммобилизации. Количество центров сорбции практически линейно зависит от обратной молекулярной массы белка. Значения констант диссоциации в целом увеличиваются при увеличении молекулярной массы. Уменьшение наклона кривых Скетчарда при увеличении концентрации белков можно объяснить стерическими препятствиями, которые создают молекулы белка друг для друга при увеличении их плотности на поверхности наночастицы.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы"; соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0015 от 05.06.2014, уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60714X0015.

НАНОЧАСТИЦЫ ИЗМЕНЯЮТ ЭЛЕКТРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Nanoparticles modify electrodynamic properties of biological objects

Титов С.В. 1., Баранова О.А. 2, Чеканов А.В. 2, Казаринов К.Д. 1

1 – ФИРЭ им.В.А.Котельникова РАН, 141 190, Фрязино, Моск. обл., ул. Введенского, 4

2 – ГОУ ВПО Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Пирогова Минздравсоцразвития, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

Тел. +7(496)565-26-85, факс +7(495)702-95-72; e-mail: kazarinov@ms.ire.rssi.ru

Разработки в области нанотехнологий известны уже более двух десятков лет. Получены наноматериалы и созданы нанотехнологии на основе золота, серебра, висмута и других металлов и их соединений, изучены свойства и методы исследования наночастиц металлов для биологии, медицины, ветеринарии, лечебной косметологии. В связи с развитием нанотехнологий становится актуальным изучение вопроса и анализа существующих данных по определению поглощения клеточными суспензиями или тканями микроволнового излучения при введении наночастиц с целью повышения избирательности патологических клеток к воздействию ЭМИ [1].

Совсем недавно суспензии, содержащие магнитные наночастицы, начали широко применяться в биомедицине. В наших работах [2,3] представлено дальнейшее развитие теории нелинейной магнитной релаксации, и, конкретно, релаксации систем суперпарамагнитных наночастиц с различными видами анизотропного потенциала (как поверхностного, так и объемного происхождения) при воздействии внешних ЭМП. Разработаны эффективные численные алгоритмы для оценки характеристик нелинейных релаксационных процессов в системах магнитных наночастиц. Разработан также эффективный метод расчета нелинейного динамического гистерезиса суперпарамагнитных наночастиц, находящихся под воздействием внешних ЭМП для случая произвольной ориентации легких осей частиц. Показана роль золотых и серебряных наночастиц в активации и гомеостазе иммунных клеток, а также влиянии на про и антиагрегационные свойства тромбоцитов крови человека [4]. При этом была отмечена возможная роль наночастиц в суспензии клеток крови в изменении поверхностного мембранного потенциала клеток, которое может привести к электропоруции клеточных мембран в естественных условиях, т.е. без внешнего электрического воздействия.

1. Казаринов К.Д., Маречек С.В., Полников И.Г. Вопросы измерения поглощенной мощности микроволнового излучения в биофизическом эксперименте // Электронная техника. Сер. 1. Техника СВЧ, 2015, Вып. 2 (525), с. 82-97.
2. Coffey W.T., Kalmykov Yu.P., Titov S.V. Magnetization reversal time of magnetic nanoparticles at very low damping // Phys. Rev. B, 2014, V. 89, N. 5, p. 054408-420.
3. Wei N., Byrne D., Coffey W.T., Kalmykov Yu.P., Titov S.V. Nonlinear frequency-dependent effects in the dc magnetization of uniaxial magnetic nanoparticles in superimposed strong alternating current and direct current fields // J.App.Phys., 2014, V. 116, p. 173903-173912.
4. Chekanov A.V., Baranova O.A., Levin A.D., Solov'eva E.Yu., Fedin A.I., Kazarinov K.D. Influence of gold nanoparticles on activation of human blood neutrophils // Biophysics. 2013, V. 58, Issue 3, p. 385-388.

ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА НА СТРУКТУРНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЫШЕЙ В ОПЫТАХ *IN VIVO***EFFECT OF IRON NANOPARTICLES ON THE STRUCTURAL STATE OF LIPIDS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES OF MICE *IN VIVO* EXPERIMENTS****Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Голощাপов А.Н., Шаталова О.В., Бурлакова Е.Б.**ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;119334, Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: bcp-lfat@mail.ru

Уникальные свойства наночастиц металлов, такие как малый размер, большая удельная поверхность и высокая реакционная способность, открывают широкие возможности их применения в биологии, медицине и сельском хозяйстве, но одновременно могут скрывать в себе серьезные опасности для человека, что требует систематических исследований. В нашем Институте давно проводятся исследования в этом направлении. Было доказано, что нанопорошки железа, цинка, меди обладали биологической активностью при введении в организм животных, имели низкую токсичность и пролонгированное действие [1]. Известно, что клеточные мембраны являются одними из главных мишеней воздействия нанообъектов на организм. Нами было обнаружено, что нанопорошок железа влиял на структурное состояние мембран эритроцитов и липосом в модельных экспериментах, вызывая фазные изменения микровязкости липидного бислоя в зависимости от концентрации, причем более эффективно действовали малые дозы нанопорошка [2]. В данной работе исследовано действия наночастиц железа на мембраны эритроцитов при введении в организм животных. Порошок железа вводили мышам в дозах 0,5 и 2 мг/кг в виде водной суспензии, и через 1-7 суток изучали структурное состояние (микровязкость) липидов мембран эритроцитов методом ЭПР-спектроскопии с использованием 2-х спиновых зондов, локализующихся в поверхностном липидном слое на разной глубине. Спектры регистрировали на ЭПР-спектрометре ER-200D SRC (Bruker), определяя время вращательной корреляции зондов. Поскольку функциональные свойства наночастиц определяются их химическим и фазовым составом, а также формой и размерами частиц, то предварительно порошок железа (полученный методом гетерофазного взаимодействия в ИМЕТ РАН) был исследован нами методом рентгеновской дифракции. Обнаружено, что он имеет кристаллическую структуру α -Fe со средним размером кристаллов 30-40 нм и содержит незначительное количество (~2%) Fe_3O_4 . Анализ фазового состава проводили методом Дебая, оценку степени дисперсности порошка железа – по ширине дифракционных линий. Судя по полученной оценке размера кристаллов, порошок железа является весьма мелкодисперсным, что, по-видимому, способствует его эффективному действию *in vivo*. Обнаружено, что введение нанопорошка железа мышам оказывало влияние на физико-химическое состояние мембран эритроцитов в крови: снижалась микровязкость в глуболежащих областях липидного бислоя (bulk-липидах) через 7 суток после введения в обеих дозах (до 12% от контроля). Изменения в поверхностной области липидов мембран эритроцитов были менее выражены. Эффект действия нанопорошка железа на клеточные мембраны зависел от введенной дозы и от времени после воздействия. Таким образом, нанопорошок железа биологически активен как *in vivo*, так и *in vitro*, что открывает перспективы применения его для диагностики и лечения различных заболеваний. Полученные результаты также крайне актуальны, учитывая широкое распространение наноматериалов в мировом производстве, и появление рисков как непосредственного контакта людей с нанообъектами при получении и переработке, так и в результате их возможного накопления в окружающей среде.

1. Ю.И. Федоров, Е.Б. Бурлакова, И.П. Ольховская / ДАН СССР 1979, 248, 1277-1281.

2. L.D. Fatkullina, A.V. Krivandin, E.B. Burlakova, A.N. Goloschapor / Oxidation Communications. 2011. V. 34. No 3. P. 701-710.

ПОИСК И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ВЫСОКОАФФИННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ЛИГАНДОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗЫ

Search and experimental testing of high-affine polymeric ligands for immobilization of inulinase

Холявка М.Г.1, Кондратьев М.С.2, Артюхов В.Г.1

1 – Воронежский государственный университет, 394006 Воронеж, Университетская пл. 1

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, 142290 Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д.3

e-mail: holyavka@rambler.ru; e-mail: ma-ko@bk.ru

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры до фруктозы, которая является источником углерода и энергии для растений и микроорганизмов. Целью работы был поиск методами компьютерного моделирования и экспериментальная проверка лигандов для иммобилизации инулиназы. В качестве модели фермента, ставшей мишенью для докинга, в банке данных Protein Data Bank была выбрана структура инулиназы из *Aspergillus ficuum* (код 3SC7). Следует подчеркнуть, что эта инулиназа была кристаллизована вместе с некоторыми органическими лигандами, в том числе с D-маннозой, которая является активатором фермента. Известное местоположение этого сахара на поверхности молекулы дало нам возможность прокалибровать выбранный пакет для докинга (Autodock VINA) на конкретном примере комплекса маннозы и инулиназы.

Изученный нами набор лигандов представлял собой высокомолекулярные соединения: гликопротеины, пролино-фениланиновый пептид, полилактат, кофеин, а также полимеры – предлагаемые нами матрицы для иммобилизации фермента. Каждый из лигандов в расчете докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Заряды на молекуле лиганда расставлялись автоматически – в пакете MGLTools 1.5.6.rc3. На основе сравнительного анализа энергий и мест связывания лигандов, а также литературных данных о строении каталитического центра инулиназы, были сделаны предположения о локализации и механизмах взаимодействия ранее предложенных нами матриц для иммобилизации с молекулой фермента. На моделях фермента инулиназы, лигандов и фрагментах матриц для иммобилизации были определены аффинности связывания и на основании этого сделаны выводы о перспективности экспериментального тестирования некоторых из соединений в качестве иммобилизационных агентов для инулиназы.

В качестве экспериментально протестированных матриц выступали ионообменные смолы (КУ-2, АВ-17-2П) и волокна (КОПАН-90, ВИОН-АН 1 и ВИОН-КН 1). Стоит отметить, что в указанном ряду лигандов наибольшей аффинностью к мишени обладала матрица катионообменной смолы КУ-2, расчет показал величину сродства -7.3 ккал/моль. Примечательно также, что все иммобилизационные агенты, по данным расчетов гибкого докинга, связываются с инулиназой в области торца ее N-домена, что стерически не модифицирует активный центр фермента. Полученные расчетные результаты хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными: при иммобилизации инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Helianthus tuberosus* процент сохранения активности у гетерогенных препаратов тем выше, чем выше аффинность фермента к матрице носителя. Предложенный нами адсорбционный способ иммобилизации фермента на ряде названных синтетических катионитов и анионитов, позволил сохранить его первоначальную каталитическую активность на ~ 80 % для инулиназы растительно происхождения и на 75.5 % для энзима из дрожжей.

МАГНИТНЫЕ И МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАНОЧАСТИЦЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМИМЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ: ОТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОСТРУКТУР И БИОМАРКЕРОВ ПАТОЛОГИЙ ДО НОВЫХ НАНОБИОМАТЕРИАЛОВ И ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ УПРАВЛЯЕМОЙ ДОСТАВКИ ВЕЩЕСТВ В ЖИДКИХ СРЕДАХ**Magnetic and metallic nanoparticles in biological and biomimetic systems: from functional physiological nanostructures and biomarkers of pathologies to new nanobiomaterials and effective means for controlled drug delivery in a liquid media****Хомутов Г.Б.**

Физический факультет Московского государственного университета имени

М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы 1, стр.2.

Тел.: +7(495)939-30-25; e-mail: gbk@mail.ru

Наноструктуры и наноматериалы на основе комплексов неорганических наночастиц и биомолекул представляют в настоящее время большой интерес для выяснения механизмов фундаментальных структурно-функциональных взаимосвязей на нано-уровне в биологических и биомиметических системах. В биологических системах неорганические нанофазные структуры синтезируются в результате процессов биоминерализации, которые протекают при нормальных условиях и в которых ключевую роль играет состав и структурная организация биомолекулярной матрицы, взаимодействующей с неорганической нано-фазой. Также, в настоящее время активно развиваются работы по использованию неорганических наночастиц и наноструктур (металлических, магнитных, полупроводниковых) для целей биодиагностики и других биомедицинских применений [1]. В данном сообщении рассмотрены вопросы, связанные с формированием магнитных наночастиц оксида железа и наночастиц благородных металлов в биологических системах, а также представлены результаты работ по созданию новых организованных композитных нанобиоматериалов и средств управляемой доставки веществ в жидких средах. Разработаны оригинальные методики и проведен синтез неорганических наночастиц благородных металлов (Au, Pd, Ag), меди и оксидов железа в геле гиалуроновой кислоты и в системе комплексов биогенного полиамина спермина. Полученные наноструктуры охарактеризованы методами ПЭМ, АСМ, оптической спектроскопии, ЭМР спектроскопии. Установлено, что в системе полимерных биогенных лигандов и неорганических наночастиц образуются организованные нанокompозитные структуры, включающие фрактальные агрегаты, микросферы, квази-линейные и планарные наноструктуры. Результаты работы указывают на возможность образования организованных ансамблей магнитных наночастиц оксида железа (магнетита, маггемита) в биологических системах при определенных условиях (ионы железа соответствующей валентности участвуют в окислительно-восстановительных процессах в водной фазе в присутствии кислорода и имеют возможность контактировать друг с другом с образованием новой неорганической нано-фазы). Аналогичные процессы образования магнитных оксидов железа могут иметь место в ходе биогенных процессов биоминерализации и метаболизма железа в норме или при патологии. Также, представлен подход к созданию эффективных средств управляемой доставки веществ в жидких средах на основе стабильных биосовместимых биомиметических нанокompозитных мембранных везикул, в состав которых входят липиды, амфифильный полиамин, функциональные наночастицы магнитных оксидов железа и золота, молекулы полиэлектролитов.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант 14-12-01379).

1. Giersig M., Khomutov G.B., (Editors.), Nanomaterials for application in medicine and biology, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2008, 188p.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТРАНСПОРТА ВНУТРИ ЭЛАСТИЧНЫХ НАНОКАНАЛОВ

Transport properties of soft-wall nanochannels

Чекашкина К.В.1,2, Ушаков А.М.2, Кузьмин П.И.2, Галимзянов Т.Р.2,3, Протопопова А.Д.1, Позмогова Г.Е.1, Клинов Д.В.1, Башкиров П.В.1,2

1 – ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

2 – ИФХЭ РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, д.31, корп. 4

3 – НИТУ "МИСиС", 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 4

Тел: +7(916)7434265; e-mail: ksenia.chekashkina@gmail.com

Исследование транспортных свойств наноканалов (радиус люмена менее 100 нм) имеет большое значение для разработки ионно-селективных мембран и нанофлюидных устройств регистрации отдельных биологически важных молекул (ДНК, белки и пр.). В большинстве случаев для этого используют твердотельные наноканалы с неизменяемой и плохо контролируемой геометрией, в то время как транспортные характеристики наноканалов определяются его геометрическими размерами. В данной работе мы проводим исследование транспортных характеристик люмена мембранных нанотрубок (НТ), стенка которых представляет собой эластичную двумерную жидкость – липидный бислой. Используемые нами патч-кламп технологии позволяют с высокой точностью контролировать геометрические параметры НТ и определять их влияние на перенос вещества через канал НТ. Стоит также отметить, что мембранные НТ являются неотъемлемой частью внутриклеточной транспортной системы.

Липидные НТ формируются из электронейтральных и заряженных липидов. Радиус люмена НТ зависит от липидного состава и изменяется от 4 до 10 нм. В настоящей работе предложен метод измерения поверхностной проводимости канала НТ, и показано, что ее вклад в общую проводимость зависит от радиуса НТ и ионной силы раствора. Был установлен и исследован процесс миграции заряженного липида в стенке НТ в электрическом поле. Также была показана селективность транспорта заряженных макромолекул внутри канала НТ.

Дальнейшее изучение особенностей переноса вещества внутри люмена НТ позволит в полной мере осуществлять контроль транспорта одиночных макромолекул через наноканалы, обладающие схожими с липидными НТ геометрическими и физическими характеристиками.

**СИГНАЛЫ ЭМР В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ И ИХ ИНФОРМАТИВНОСТЬ
ДЛЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ****EMR signals in biological systems and their informative capacity for
medical-biological investigations****Юртаева С.В.1, Ефимов В.В.2, Сальников В.В.3**

1 – КФТИ КазНЦ РАН, 420029, Казань, ул. Сибирский тракт, 10/7

2 – ИФМБ КФУ, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

3 – КИББ КазНЦ РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31

Тел.: +7(843)292-80-05; факс: +7(843)272-50-75; e-mail: svetlana.vish@rambler.ru

Известно, что живая материя от бактерий до человека содержит природные наночастицы оксидов железа, которые образуются в результате процессов биоминерализации. Наиболее распространенными магнитными наночастицами в живых организмах являются магнетит и ферригидрит (в ядре белка ферритина), которые играют важную роль, как в функционировании живых систем, так и в развитии патологических состояний, таких как патологии мозга, развитие опухолевых процессов, участие в механизмах адаптации и др. Данного рода частицы приводят к появлению магнитных свойств в биосистемах и возникновению сигналов электронного магнитного резонанса (ЭМР).

Целью данной работы было изучение характеристик сигналов ЭМР кристаллических наночастиц биогенного происхождения в образцах биологических тканей. На основе этих характеристик предполагается разработка методики обнаружения и идентификации кристаллических наночастиц оксидов железа методом электронного магнитного резонанса для использования в биомедицинских исследованиях и в целях медицинской диагностики.

В работе определены характеристики сигналов ЭМР в различных биологических тканях, свидетельствующие об образовании кристаллов магнетита: характерное немонокотное температурное поведение резонансного поля, ширины линии и интегральной интенсивности, наличие аксиальной и кубической компонент в анизотропии резонансного поля.

Данный факт подтвержден микроскопическими исследованиями методом ПЭМ. Получены микроскопические изображения распределения наночастиц в опухолевых и здоровых тканях человека, а также в ткани нервной системы виноградной улитки. Обнаружены скопления наночастиц в тканях в виде массивов, цепочек, что подтверждает возможность их детектирования методом ЭМР.

Исследование тканей крыс после гипогравитации обнаружило несколько типов анизотропных сигналов ЭМР, свидетельствующих об аномальном накоплении железа в тканях в различных формах агрегации и упорядочения наноразмерных оксидов железа.

Исследования сигналов ЭМР биологических тканей и крови с применением метода ЭПР спектроскопии показали, что данный метод является перспективной методикой для детектирования аномального накопления железа в биологических тканях и крови в форме нанокристаллитов магнетита и ферригидрита, что дает новую информацию для диагностики различных патологий.

Детектирование кристаллических форм накопления железа в тканях и крови может дать абсолютно новую биохимическую информацию, а также новый инструмент в исследовании биологических процессов. Результаты исследования могут способствовать более глубокому пониманию роли биогенных наночастиц в живых системах.

1. Yurtaeva S.V., Efimov V.N. et al / Applied Magnetic Resonance. 2012, V.42, No 3, P.299-313.

2. Юртаева С.В. / Ежегодник КФТИ 2013, Изд. Казань: Физтехпресс 2014. С.105-107.

3. Юртаева С.В., Ефимов В.Н. и др. / Ежегодник КФТИ 2012, Изд. Казань: Физтехпресс, 2013. С.122-126.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ В-ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА ПРОЦЕССЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА МЕТА-ТЕТРАГИДРОКСИФЕНИЛХЛОРИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Influence of β -cyclodextrin derivatives on photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin distribution in biological systems

Янковский И.В. 1,2, Яковец И.В. 1, Болотина Л.Н. 2, Зорин В.П. 1

1 – Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030 Минск, Беларусь
vpzorin@mail.ru

2 – Лаборатория CRAN, Университет Лотарингии, 54500 Нанси, Франция

Применение фотосенсибилизатора мета-тетрагидроксифенилхлорина (мТГФХ) при проведении ФДТ связано с рядом проблем, обусловленных высокой степенью гидрофобности данного соединения. При введении в водные растворы, в том числе в плазму крови, молекулы мТГФХ агрегируют, что приводит к нарушению процессов распределения фотосенсибилизатора в организме и снижению его фотосенсибилизирующей активности. С целью увеличения биодоступности мТГФХ и улучшения его фотофизических свойств предложено вводить данный фотосенсибилизатор в составе специальных фармакологических форм (липосомы, эмульсии и т.п.). Хорошо известным способом увеличения водорастворимости лекарственных соединений является использование для их введения природных и синтетических циклодекстринов. Производные β -циклодекстрина (β -CDs) в настоящее время широко используются в качестве систем введения для ряда лекарственных препаратов, при этом не только предотвращается агрегация в крови, но и значительно снижается скорость их химической деградации. Предполагается, что β -CDs могут быть использованы при ФДТ в качестве систем введения арилзамещенных порфиринов.

Целью настоящей работы являлось исследование механизмов взаимодействия мТГФХ с рядом β -CDs (β -циклодекстрин, метил-, диметил- и триметил- β -циклодекстрин) и оценка влияния этих циклических олигосахаридов на процессы распределения мТГФХ в различных биологических системах. Флуоресцентные и абсорбционные измерения показали, что все исследованные β -CDs с высокой эффективностью образуют комплексы включения с мТГФХ. Установлено, что типичные значения для кажущихся констант образования комплексов мТГФХ и m - β -CD велики: $K_{1,1} \approx 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ для мТГФХ : m - β -CD комплекса and $K_{1,2} \approx 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ при образовании комплекса мТГФХ : 2 m - β -CD. Вследствие высокой аффинности β -CDs оказывают сильное влияние на все стадии процессов распределения мТГФХ в модельных биологических системах и в организме *in vivo*. Показано, что в малых концентрациях β -CDs значительно ускоряют процессы дезагрегации мТГФХ в крови и в клеточных культурах. В присутствии мТГФХ в концентрации $1-12 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ процесс агрегации молекул фотосенсибилизатора полностью предотвращается. Согласно полученным данным небольшие концентрации of β -CDs увеличивают скорость миграции мТГФХ между различными центрами связывания в белках плазмы, клетках и тканях. Данный эффект приводит к ускорению процесса накопления мТГФХ в клетках в первые несколько часов после введения сенсibilизатора в культуру. В экспериментах с мышами носителями переносимых опухолей показано, что β -CDs модифицируют процессы распределения фотосенсибилизатора между различными органами и тканями. Наиболее значительные изменения фармакокинетического профиля мТГФХ характерны для для концентрации сенсibilизатора в мышечной ткани, опухоли, печени и почек. Обсуждается возможность применения β -CDs для улучшения фармакокинетических характеристик мТГФХ при проведении ФДТ.

Нейродинамика и нейробиология

МЕТОД МЕЖЧАСТОТНОЙ ВЕЙВЛЕТ-КОГГЕРЕНТНОСТИ

The cross-frequency Wavelet coherence method

Асташев М.Е.1,2, Асташева Е.В.2, Гудков С.В.2

1 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, МО, Пущино, ул. Институтская, 3

2 – Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, МО, Пущино, ул. Институтская, 3

Тел.: +7(4967)73-93-47; e-mail: astashev@yandex.ru

Классический анализ сигналов многокомпонентных сигналов (например, электроэнцефалограмм) состоит в выделении в сигнале характерных спектральных полос, анализе их мощности с целью сопоставления их с наблюдаемыми эффектами (например, установленными физиологическими реакциями). Определение фазовых сдвигов в частотных компонентах сигнала дает дополнительную информацию, и позволяет выявить факт синхронизации сигналов и решить вопрос об их источнике. Анализ разницы фазы между частотами в одном сигнале осложнен необходимостью точного определения частоты каждого из сигналов для эффективной компенсации временной эволюции фазы. Нами разработан метод построения и визуализации разницы фаз между частотными компонентами одного сигнала. Метод основан на комплексном непрерывном вейвлет преобразовании и является развитием метода анализа вейвлет-когерентности [1]. Он позволяет эффективно компенсировать неточности определения частот сигналов и анализировать изменение разницы фаз между частотами во времени. На бодрствующих животных (морских свинок) нами исследована осцилляторная активность восьми структур мозга во время электрической стимуляции – генерации судорожных разрядов, вызванных стимуляцией глутаматергического неокортикального входа в гиппокамп (перфорирующего пути, интенсивность стимула 100-500 мкА, длительность – 0,3-0,8 мс, частота 10 Гц). Электроды для регистрации локальных полевых потенциалов (ЭЭГ) были вживлены в следующие структуры: 1. энторинальную кору, 2. супрамамиллярное ядро, 3. центральное ядро амигдалы, 4. медиальную септальную область, 5. зубчатую фасцию, 6. поле СА1 гиппокампа, 7. фронтальную кору, 8. латеральную септальную область. В перфорирующий путь имплантировали биполярные раздражающие электроды, используемые при стимуляции и вызове острой судорожной активности. Метод межчастотной фазовой вейвлет-когерентности позволил выявить среди изученных структур две группы структур со сходным изменением разности фаз между устойчивыми колебательными процессами в частотных диапазонах 4 и 8 Гц: 1. энторинальная кора, зубчатая фасция, и поле СА1 гиппокампа; 2. супрамамиллярное ядро, центральное ядро амигдалы, медиальная септальная область и латеральная септальная область. Это указывает на их функциональное взаимодействие в процессе судорожной активности после электрической стимуляции и может быть подтверждением гипотезы Фрайса о ритмической модуляции нейронной возбудимости [2]. Таким образом, метод является эффективным инструментом для получения дополнительной информации о характере синхронизации компонентов сложных сигналов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00730

1. Bandrivskyy A., Bernjak A., McClintock P., Stefanovska A. / Cardiovascular Engineering: An International Journal, Vol. 4, No. 1, March 2004
2. Fries P. / Trends Cogn Sci. 2005, 9(10), 474-80.

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КУЛЬТУР ГИППОКАМПА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ IN VITRO**Brain-derived neurotrophic factor's effect on the functional metabolic activity in primary hippocampal cultures during the acute hypoxic conditions in vitro*****Астраханова Т.А. 1, Ведунова М.В. 1,2, Митрошина Е.В. 1,2, Мухина И.В. 1,2***

1 – ННГУ им. Н.И. Лобачевского, ИББМ, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

2 – ГБОУ ВПО Нижегородская медицинская академия Минздрав РФ, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 70

Тел.: +7(902)300 16 33, e-mail: astrahanova.tatyana@yandex.ru

Кислородная недостаточность является одной из основных причин гибели клеток при целом ряде патологий. Нейроны одни из самых чувствительных к нехватке кислорода клеток организма, в связи с этим проблема гипоксии мозга сохраняет чрезвычайную биологическую и медицинскую значимость.

Цель исследования – изучить влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на метаболическую активность диссоциированных культур гиппокампа при моделировании нормобарической гипоксии.

В исследовании *in vitro* использованы культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА. На 14-й день развития культуры клеток подвергались гипоксическому воздействию. В исследуемые культуры превентивно добавляли 1нг/мл BDNF.

Оценка функциональной активности проводилась на 7-й день после гипоксического воздействия. Для выявления изменений в функциональной активности после моделирования гипоксии осуществляли регистрацию спонтанных кальциевых осцилляций. Для исследований динамики изменения концентрации ионов кальция использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 NLO DuoScan. Индикатор – кальциевый краситель Oregon Green BAPTA-1, возбуждаемый линией излучения аргонового лазера 488 нм (флуоресценция которого регистрировалась в полосе 500–530 нм). Регистрировались временные серии изображений поля флуоресценции красителя. Детекция мРНК осуществлялась на 1-й день после моделирования гипоксии. Для детекции использовался РНК-детекторный зонд SmartFlare, флуоресценция которого регистрировалась гелий-неоновым лазером, с $\lambda = 633$ нм и светофильтром с полосой пропускания 650-710 нм.

Проведенные исследования показали, что гипоксия вызывает необратимые изменения в спонтанной кальциевой активности первичных диссоциированных культур гиппокампа. Установлено, что количество клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность достоверно ($p < 0,01$) снижается. После моделирования гипоксии практически не фиксируются синхронные кальциевые события. Превентивное добавление BDNF частично нивелирует негативные последствия нормобарической гипоксии. Показано увеличение процента клеток культуры, проявляющих спонтанную функциональную кальциевую активность и достоверное ($p < 0,05$) увеличение частоты кальциевых событий в культурах, подвергшихся гипоксии. Также установлено, что BDNF влияет на увеличение количества клеток, в которых активируется синтез мРНК NFkB1 при нормальных условиях, но явление активации синтеза мРНК NFkB1 в условиях гипоксии не зафиксированы. Таким образом, нейропротекторные и антигипоксические свойства BDNF не связаны с активацией экспрессии белка NF-kB1.

КОРРЕЛЯЦИОННО-ДЕКРЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭНЦЕФАЛОГРАММ

Decrement-correlation analysis of Electroencephalogram

Бахарев Б.В., Жадин М.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН,
г. Пущино Московской области
e-mail: boris_baharev@mail.ru

В предыдущих работах [1] изучалась модель формирования ритмических процессов в коре головного мозга. Исследовались интегральные уравнения средних по ансамблю мембранных потенциалов возбудительных – аналога электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и тормозных нейронов неокортекса. Качественный нелинейный анализ этих уравнений показал, что для небольших отклонений от стационарных значений решение представляет собой сумму сверток внешних сигналов с оригиналами соответствующих функций. Если в качестве афферентного притока взять дискретный белый гауссов шум, то ЭЭГ в линейном приближении в области устойчивых решений моделируется действительной частью свертки централизованного дискретного белого шума с гармоническими функциями, имеющими отрицательные декременты. Представление электроэнцефалограммы в виде сигнала, состоящего из суммы основных ритмов

ЭЭГ: $\xi(t) = \text{Re } x$, $x(t) = \sum_{l=1}^m x_l$, где $x_l(t) = \int_0^t q(t') k_l \exp(z_l \times (t - t')) dt'$, $z_l = \alpha_l + j\omega_l$, а x_l

энцефалографический ритм, порождающийся дискретным (равномерно разрывным) белым гауссов шумом $q(t)$, общим для всех ритмов, с шагом дискретизации Δt и дисперсией σ_q^2 , приводит к следующей оценке автокорреляционной функции:

$$R_\xi(\tau) = \frac{\Delta t^2 \sigma_q^2}{2} \sum_{l=1}^m k_l \text{Re} \left\{ \exp(z_l \tau) \sum_{v=1}^m k_v \left[\frac{1}{1 - \exp(z_l + z_v) \Delta t} + \frac{1}{1 - \exp(2\alpha_v + z_l - z_v) \Delta t} \right] \right\}.$$

В качестве проверки предлагаемого метода моделировалась ЭЭГ с известными параметрами, что позволило оценить точность предлагаемого метода. Вычислялись и усреднялись нормированные автокорреляционные функции длительностью 1 сек (эпоха анализа 5 сек). Определялся средний спектр мощности в диапазоне 0-20 Гц, с использованием сглаживающей функции Парзена. В зависимости от числа экстремумов методом наименьших квадратов подбирались частоты и декременты модельной ЭЭГ. Частные производные по параметрам суммы квадратов разностей моделируемой автокорреляционной функции и реальной приравнивались нулю. Решалась система нелинейных уравнений методом Ньютона – Канторовича через матрицу Якоби. По времени пересечения усредненной автокорреляционной функции оси абсцисс определялись начальные значения коэффициентов k модели. ЭЭГ с известными параметрами позволило оценить точность предлагаемого метода. Лучшие результаты (расхождения менее 5%) получались при частоте дискретизации 1 кГц, что необходимо для более точного определения пересечения средней автокорреляционной функцией с осью абсцисс, при увеличении числа суммаций (эффект метода синхронного суммирования), увеличения точности итераций подбора частоты и декремента теоретической автокорреляционной функции несколько позволяет операционная система MATLAB. Т. о., была показана возможность определения декрементных параметров ЭЭГ с приемлемой точностью. Данная методика апробировалась на записях ЭЭГ крыс и мышей.

ОБНАРУЖЕНИЕ И АНАЛИЗ ПАТТЕРНОВ КОЛЛЕКТИВНОЙ ДИНАМИКИ В НЕЙРОБИЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ**Detection and analysis of collective dynamics patterns in neuroscience data****Браже А.Р.**

Кафедра биофизики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

e-mail: brazhe@biophys.msu.ru

Динамические изображения различной модальности (фМРТ, многофотонная микроскопия, лазер-спекл контраст и др.), а также другие методы исследования активности клеток, например, многоэлектродная регистрация в коре мозга, позволяют исследовать процессы клеточной сигнализации, кодирования и обработки информации в нервной системе. Динамические изображения, при этом, стараются получать с максимально возможным пространственным и временным разрешением, что приводит к накоплению больших объемов экспериментальных данных. Наличие взаимных корреляций и коллективной динамики приводит к тому, что «полезный сигнал» может быть описан меньшим количеством переменных, чем полная размерность данных. Для решения этой задачи требуется использование и разработка математических методов выделения, классификации и визуализации этих полезных компонент, представления исходных данных в пространствах меньшей размерности, подавления шума. Анализ и интерпретация таких данных представляет собой актуальную и нетривиальную задачу. Во многих случаях задача сводится к «разреживающему» представлению данных, как комбинации нескольких компонент, представляющих интерес, и фонового шума. Подходы к поиску наиболее информативных компонент могут исходить из априорной информации о механизмах, лежащих в основе наблюдаемой динамики, либо на основе «обучения» непосредственно на основе полученных данных.

Разрабатываемое автором программное обеспечение [1] позволяет исследовать динамические изображения различной модальности методом разложения на главные и независимые компоненты, многомасштабного (вейвлет) преобразования, картирования колебательных компонент динамики, проводить кластерной и корреляционный анализ сигналов в различных участках изображения. В частности, адаптация метода т.н. многомасштабной модели зрения, основанного на вейвлет-преобразовании изображений, позволила более полно исследовать особенности динамики спонтанных межклеточных кальциевых волн в сетях астроцитов *in vivo* [2]. Успех современного развития таких математических методов и подходов как Compressive sensing и Deep learning диктует необходимость их адаптации и использования для обработки и интерпретации нейробиологических данных, что является текущим приоритетом разработки данного программного обеспечения.

1. <https://github.com/abrazhe/image-funcut>
2. Brazhe A., Mathiesen C., Lind B., Rubin A., Lauritzen M. Multiscale vision model for event detection and reconstruction in two-photon imaging data. *Neurophotonics*. 2014, 1(1):011012.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И GDNF

Molecular mechanisms of neuroprotective action of neurotrophic factors BDNF and GDNF

Ведунова М.В. 1,2, Мищенко Т.А.2,1, Шишкина Т.В. 1,2, Митрошина Е.В.2,1, Мухина И.В. 2,1

1 – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Нижний Новгород,

2 – Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород,

Тел.: +7(831)465-46-43; факс: +7(831)465-42-81; e-mail: Mvedunova@yandex.ru

Одним из актуальных вопросов современной нейробиологии и медицины является изучение эндогенных механизмов защиты клеток нервной системы от действия повреждающих факторов. Понимание роли отдельных звеньев, обеспечивающих устойчивость нервной системы, позволяет разрабатывать фундаментальные основы для новых терапевтических стратегий с использованием эндогенных веществ, что, в свою очередь, имеет ряд преимуществ (низкая иммуногенность, высокая биодоступность, максимальная тропность к месту воздействия). Среди возможных эндогенных соединений, участвующих в поддержании жизнеспособности и функциональной активности нервных клеток в стрессогенных условиях, выделяют нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Ранее нами было показано, что данные белки обладают выраженными нейропротекторными свойствами в условиях гипоксического воздействия, а совместное применение нейротрофинов снижает эффективность защитного действия. Однако в связи с недостаточностью знаний о механизмах действия BDNF и GDNF в условиях кислородной недостаточности очевидна необходимость дальнейших исследований. Материалом для исследований служили первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА. Для изучения молекулярных механизмов действия нейротрофинов осуществлялась детекция мРНК BDNF и GluR2 с использованием РНК-зондов (SmartFlare, MerckMillipore). Применение РНК-зондов позволяет прижизненно исследовать активацию гена и появление в цитоплазме мРНК. Каждый РНК-зонд состоит из золотой наночастицы, конъюгированной с многочисленными копиями двунитевого олигонуклеотида, в котором одна нить включает флуорофор, блокированный золотой наночастицей. При контакте РНК-зонда со своей РНК-мишенью, одна из нитей олигонуклеотида связывается со своей комплементарной нитью и заменяет репортерную нить. При отсоединении репортерной нити флуорофор более не блокируется золотой наночастицей, флуоресценция может быть детектирована. Проведенные исследования показали, что гипоксия вызывает достоверное ($p < 0,05$) снижение процента клеток экспрессирующих мРНК BDNF (контроль $39,5 \pm 4,2$, гипоксия $19,0 \pm 2,1$). В условиях нормоксии аппликация GDNF приводит к угнетению экспрессии мРНК BDNF более чем в 2,3 раза. Таким образом, подавление экспрессии мРНК BDNF может рассматриваться как один из факторов нивелирующий синергизм данных нейротрофинов в условиях гипоксии. При оценке влияния нейротрофинов на уровень экспрессии одной из субъединиц AMPA-рецепторов GluR2 показано, что гипоксия приводит к достоверному снижению процента мРНК GluR2 позитивных клеток. Применение GDNF способствует сохранению высокого уровня экспрессии мРНК GluR2. BDNF не влияет на процент мРНК GluR2 позитивных клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601. Публикация частично подготовлена в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований».

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И ГЛУТАТИОН-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ
В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАСТУЩИХ КРЫС****Changes in the activity of catalase and glutathione dependent enzymes in rat brain subcellular fractions during early postnatal development**

Галкина О.В., Бахтюков А.А., Ещенко Н.Д.

Кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9 Тел.: +7(812)328-2182; e-mail: galkina@bio.spbu.ru

В клетках млекопитающих, гидроперекиси, включая H_2O_2 , генерируются в течение аэробного метаболизма. Они должны постоянно утилизироваться, чтобы предотвратить окисление клеточных компонентов. Процессы детоксикации перекисей осуществляются несколькими антиоксидантными ферментами, основными из которых являются каталаза (КАТ) и глутатионпероксидаза (ГП). Восстановление гидроперекисей может катализировать глутатионтрансфераза (ГТ). Эти процессы особенно важны для мозга, поскольку клетки этого органа потребляют значительные концентрации O_2 , а также имеют потенциал для образования активных форм кислорода в больших количествах. В последнее время большое внимание уделяется вопросам неустойчивости головного мозга к окислительному стрессу в эмбриональный и ранний постнатальный период. Целью данной работы было изучение характера возрастных изменений активности КАТ, ГП и ГТ в субклеточных фракциях больших полушарий головного мозга крыс на 5-й, 10-й, 20-й и 30-й день постнатальной жизни (ДПЖ) и у взрослых животных. Для сравнения аналогичные исследования проводились в субклеточных фракциях печени. Показано, что активность ферментов в головном мозге развивающихся и взрослых животных находится на довольно низком уровне по сравнению с таковыми в печени, в особенности это касается каталазы. Это позволяет предположить, что каталаза не играет существенной роли в головном мозге. Характер изменений активности ферментов в мозге и печени также различается: в печени происходит постепенное увеличение активности с возрастом, тогда как в мозге эти изменения носят скачкообразный характер. В цитоплазматической фракции головного мозга на 5-й ДПЖ показана более высокая активность КАТ (39% от уровня взрослых), чем у 10-ти дневных животных (9%), последующее увеличение активности до взрослых значений начинается после 20-го дня. В синаптосомальной фракции максимальный рост активности КАТ наблюдается с 10-го по 20-й день – в период интенсивного синаптогенеза. Активность ГП и ГТ в целом увеличивается с возрастом во всех исследованных фракциях, за исключением фракции миелина, где отмечена тенденция к снижению активности ГП. В цитоплазматической и митохондриальной фракциях также наблюдается более высокая активность ГП на 5-й ДПЖ (17% и 4,2% соотв. от уровня взрослых), чем на 10-й ДПЖ (9,5% и 1,1% соотв.). Дальнейшее увеличение активности фермента в цитозоле происходит только к 30 дню, а в митохондиях – к 20 дню. Отмеченный всплеск активности исследованных ферментов на ранних этапах развития головного мозга может быть связан с приспособлением организма к существованию в кислородной среде. Таким образом, в незрелом мозге активность ферментов антиоксидантной системы в целом ниже, чем у взрослых животных. Становление антиоксидантной системы мозга сопровождается перераспределением ферментов между субклеточными фракциями, а также изменением соотношения основных путей устранения H_2O_2 : увеличением активности ферментов системы глутатиона и снижением доли активности каталазы.

РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ ПРИ РАЗВИТИЕ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И МЕДУЛЛОБЛАСТОМ

The role of gap junction during the development of the human brain glial tumors and medulloblastoma

Гранкина А.О., Кириченко Е.Ю., Логвинов А.К., Акименко М.А., Филиппова С.Ю., Рожков А.Ю., Чурюмова Г.А.

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии, Лаборатория функциональной нейроморфологии и электронной микроскопии, 344090, Ростов-на-Дону, пр. стачки, 194/1, к. 701

Тел.: +7(903)470-86-25; e-mail: grankina.anastasia@mail.ru; kiriche.evgeniya@yandex.ru

По данным классификации ВОЗ (2007), медуллобластомы и глиальные опухоли мозга человека (в частности пилоцитарные астроцитомы и плеоморфные ксантоастроцитомы) признаны самыми распространенными опухолями центральной нервной системы детского возраста. Пилоцитарная астроцитома (I класс ВОЗ) является наиболее распространенной опухолью мозга у детей, характеризуется предрасположенностью к возникновению кист и низкими темпами роста. В большинстве случаев данная опухоль доброкачественная, не имеет гендерной предрасположенности, основным местом локализации является мозжечок. Плеоморфная ксантоастроцитома (II класс ВОЗ) – астроцитарные новообразования, как правило, встречающиеся у детей и молодых взрослых, с поверхностным расположением в полушариях мозга и вовлечением мозговых оболочек. Медуллобластома – злокачественное новообразование, развивающееся из недифференцированных эмбриональных клеток преимущественно в мозжечке [1].

В гистологической практике в качестве основных антител для иммунотипирования используются: Синаптофизин (SYP) – белок синаптических везикул; Нейрофиламенты (NF) – основные структурные компоненты клеточного каркаса; Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) – белок промежуточных филаментов в астроглии и в клетках глиального происхождения.

В настоящее время считается, что патогенез опухолей ЦНС может быть связан с нарушением межклеточных взаимодействий посредством щелевых контактов (ЩК) [2]. По своей сути, ЩК являются критическими мембранными структурами для поддержания нормального эмбрионального развития и клеточных функций, в том числе пролиферации, дифференцировки и взаимодействия с окружающей тканевой средой [3]. Нарушение этих функций имеет значительное этиопатогенетическое значение для формирования новообразований [4, 5]. Данные об изменениях ЩК при развитии глиальных опухолей мозга человека и медуллобластом немногочисленны, в значительной своей части получены в исследованиях на культурах клеток и отличаются противоречивостью [6, 7].

1. Louis D.N., Ohgaki H. et al (Eds.): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC: Lyon 2007, P. 312.
2. Naus C.C., Laird D.W. / Nat. Rev. Cancer, 2010, V. 10(6), P. 435-441.
3. Vinken M., Vanhaecke T., et al. C / Cell Signal, 2006, V. 18, P. 592-600.
4. Trosko JE, Ruch RJ. / Front Biosci, 1998 V. 3, P. 208-36.
5. Krutovskikh V., Piccoli C., Yamasaki H. / Oncogene, 2002, V. 21, P. 1989-99.
6. Cottin S., Gould P V., et al. / Cancer Gene Ther, 2011, 18(9):674-81.
7. Sun P., Liu Y., et al. / Oncology rep., 2012, V. 28, P. 969-76.

“ПРОСТЫЕ НЕРВНЫЕ СИСТЕМЫ” В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ**“Simple Nervous Systems” in studies of the epigenetic mechanisms of the long-term memory formation****Гринкевич Л. Н.**

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 г. Санкт-Петербург, Наб. Макарова 6. Россия; E-mail: Larisa_Gr_spb@mail.ru

Одной из сложнейших задач нейробиологии является выяснение роли эпигенетических механизмов формирования долговременной памяти. Важнейшую роль в эпигенетической регуляции играет модификация гистонов, приводящая к изменению пространственной структуры хроматина что в конечном итоге, приводит к изменению экспрессии генов. Наиболее интенсивно изучается ацетилирование и метилирование гистонов так как показана возможность через воздействие на эти процессы влиять на ментальные характеристики, нарушенные в ряде патологий. При этом ацетилирование гистонов индуцирует экспрессию генов, а метилирование вызывает как индукцию, так и репрессию в зависимости от сайтов и степени метилирования. Существенную роль в прогрессе исследований сыграли животные с простыми нервными системами. Нами в качестве модели обучения используется выработка условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии у моллюска *Helix*. Рефлекс хорошо изучен на поведенческом и клеточном уровнях. Описана его нейронная сеть. Показано, что основным пластическим звеном являются гигантские командные нейроны оборонительного поведения. Проведенные нами молекулярные исследования показали, что в формировании пищевой аверзии важную роль играет ацетилирование и метилирование гистонов и эти процессы серотонин-зависимы. Более того, исследование нейрональной сети рефлекса показало наличие асимметрии в ацетилировании и метилировании гистона H3 в командных нейронах левого (ЛПаГ) и правого париеальных ганглиев (ППаГ), выполняющих сходные функции и расположенных симметрично. В нейронах ППаГ наблюдался рост ацетилирования и метилирования гистона H3, тогда как в нейронах ЛПаГ изменений не отмечено. При этом метилирование гистона H3 индуцируется как по активаторным, так и ингибиторным сайтам. Исходя из полученных данных нами выдвинуто 2 положения: 1-е о наличии латеризации памяти у *Helix* и 2-е — о вовлечении в эпигенетическую регуляцию процессов торможения. Учитывая, что основным активаторным медиатором в формировании рефлекса является серотонин, опосредующий действие сенситизирующего болевого стимула, а тормозным нейропептид FMRFамид мы провели сравнительный анализ влияния этих веществ на эпигенетические процессы в функционально различных ганглиях ЦНС. Обнаружено, что инкубация ЦНС *Helix* с серотонином индуцирует метилирование гистона H3 по активаторным и ингибиторным сайтам в подглоточном комплексе ганглиев, специализирующимся на оборонительном поведении, а инкубация с FMRF-амидом снижает метилирование гистона по данным сайтам. Как и в случае с обучением наблюдается асимметрия метилирования в командных нейронах. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что активаторные и ингибиторные процессы, опосредуемые серотонином и FMRFамидом, могут взаимодействовать на эпигенетическом уровне, через метилирование гистона H3, что может лежать в основе конвергенции активаторных и тормозных путей, вовлекаемых в формирование долговременной памяти с дальнейшей регуляцией экспрессии генов, вовлекаемых в пластические перестройки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01681

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВЫЗЫВАЕТ ПОЯВЛЕНИЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ В МОДЕЛЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Ischemic tolerance in rat cerebral cortex after photothrombotic infarction

Демьяненко С.В., Шарифулина С.А., Бережная Е.В., Ковалева В.Д., Негинская М.А.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, 344090, г. Ростов-на-Дону, Просп. Стачки 194/1

Тел.: +7(863)-243-31-11; e-mail demyanenkosvetlana@gmail.com

Эффект ишемической толерантности (ИТ), состоит в том, что мягкое ишемическое воздействие, недостаточное для массовой гибели нервных клеток, защищает мозг от последующего повреждения. Мы использовали модель ишемического инсульта, в которой локальный фототромботический инфаркт мозга (ФТИ) возникает после фотодинамического (ФД) действия гидрофильного фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР). Локальное лазерное облучение (532 нм, 60 мВт/см², 30 мин, диаметр луча 3 мм) коры мозга крысы после внутривенного введения БР, приводит к окислительному повреждению эндотелия и базальной мембраны, агрегации тромбоцитов и окклюзии мелких сосудов. Это вызывает ФТИ с отеком мозговой ткани и глобальным некрозом нейронов и глиальных клеток. Зона инфаркта окружена 1,5-мм пенумброй. Через 4 часа после ФТИ в пенумбре наблюдается перичеллюлярный отек, гипо- и гиперхромия нейронов. На ее периферии – островки нормальной ткани, которые увеличиваются по мере удаления от ядра инфаркта. Максимальные морфологические изменения в пенумбре наблюдаются через 24 часа после ФТИ. Затем они ослабевают и исчезают к 21 суткам после воздействия. Второе лазерное облучение контралатеральной коры мозга через 7 суток также вызывает ФТИ. При этом первичный односторонний ФТИ, как прекодиционирующий фактор, обеспечивает ишемическую толерантность: через 14 суток после второго воздействия объем ядра инфаркта в коре мозга был достоверно ниже на 24% ($p < 0.05$), чем после однократного воздействия. Сенсомоторный дефицит у крыс, подвергнутых ФТИ, был зарегистрирован в поведенческих экспериментах с помощью тестов «тестовый цилиндр» и «нога-ошибка». При двукратном ФТИ первое воздействие оказывало прекодиционирующий эффект и через 14 суток снижало сенсомоторный дефицит на 50%, вызванный вторым воздействием по сравнению с однократным воздействием. Т.е. первый ФТИ вызывал эффект ишемической толерантности к последующему воздействию.

В опытах *in vitro* на изолированных механорецепторах растяжения речного рака, состоящих из одиночных нейронов, окруженных глиальной оболочкой, также отмечалась толерантность к последующему ФД воздействию. Предварительное 5-секундное ФД воздействие (фотосенс, 10 нМ, инкубация 30 мин; облучение: 670 нм, 100 мВт/см²) достоверно снижало уровни некроза нейронов и глиальных клеток, вызванных последующим 30-мин ФД воздействием, на 66% и 46% ($p < 0.05$), соответственно. Более длительное предварительное воздействие (10-60 сек), наоборот, увеличивало фоточувствительность этих клеток и повышало уровень ФД-индуцированного некроза и апоптоза этих клеток на 68% и 93%, соответственно. Таким образом, выявлен феномен ишемической толерантности у крыс, когда второй фототромботический инфаркт создавался через 7 дней после первого. В экспериментах *in vitro* на изолированных рецепторах растяжения рака также обнаружен эффект прекодиционирования.

Исследования прекодиционирования поддержаны грантом РФФИ (№14-04-00741); морфологические исследования – грантом Российского научного фонда (№14-15-00068).

ЭКСПРЕССИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПЕНУМБРЕ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНФАРКТА В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**Expression of neuronal proteins in penumbra after local photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex*****Демьяненко С.В., Узденский А.Б.***

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, 344090, г. Ростов-на-Дону, Просп. Стачки 194/1

Тел.: +7(863)-243-31-11; e-mail demyanenkosvetlana@gmail.com

При ишемическом инсульте за несколько минут развивается некроз нервной ткани, и зона поражения распространяется из ядра инфаркта на прилегающие ткани, формируя переходную зону – пенумбру. Быструю смерть клеток в ядре инфаркта предотвратить нереально, но в пенумбре можно сохранить клетки, где их повреждение развивается за несколько часов. Для изучения механизмов нейродегенерации и нейропротекции в пенумбре мы вызывали локальный фототромботический инфаркт (ФТИ) нервной ткани в мозге крысы. Лазерное облучение сомоторной коры мозга (532 нм, 60 мВт/см², 30 мин, диаметр луча 3 мм) после в/в введения гидрофильного фотосенсибилизатора бенгальского розового, который не пересекает гематоэнцефалический барьер и остается в кровяном русле, вызывает закупорку микрососудов головного мозга. Гистологическое исследование показало, что при данных параметрах облучения зона инфаркта окружена пенумброй шириной около 1,5 мм. Через 1 и 4 часа после ФТИ в ядре инфаркта развивались отек, вакуолизация ткани, набухание внутриклеточных органелл и разрушение синапсов. В пенумбре наблюдали сходные, но менее выраженные морфологические изменения, градуально уменьшающиеся на периферии. С помощью микрочипов Panorama Antibody – Neurobiology (Sigma-Aldrich), содержащих иммобилизованные антитела против 224 нейрональных и сигнальных белков было показано, что через 1 час после ФТИ в пенумбре на 30-80% повышалась экспрессия белков, участвующих в поддержании целостности и навигации аксонов (NAV3, MAP1, CRMP2), их миелинизации (PMP22), межклеточных взаимодействиях (N-кадгерин), синаптической передаче (глутаматдекарбоксилаза, триптофангидроксилаза, MUNC-18-3 и synphilin-1); контроле качества митохондрий и митофагии (PINK1 и Паркин), убиквитин-опосредованном протеолизе (UCHL1, PINK1 Паркин, synphilin-1), а также сигнальных белков (PKC α , ERK5) по сравнению с таковыми в контралатеральном полушарии. Эти изменения, в основном направлены на защиту ткани мозга. Одновременное снижение уровня протеинкиназы С и белка TDP-43 также может противодействовать повреждению нервной ткани. Через 4 часа изменения белкового профиля усиливались. Кроме указанных, повышалась экспрессия белков, участвующих в метаболизме липидов (LPR1), везикулярном транспорте (TMP21), появлялись β -амилоид и прионовые белки. При этом снижалась экспрессия таких белков, как CRMP1, FRAT1, дублклортин, NUMB, VILIP-1, HtrA2, ALS, участвующих в регуляции роста аксонов и миграции клеток, Wnt/ β -катениновой сигнализации, апоптозе. Таким образом, изменения экспрессии ряда нейрональных белков через 1 час после ФТИ связаны с развитием защитных процессов в коре головного мозга, но через 4 часа наряду с защитными процессами, в коре мозга развиваются процессы повреждения. Некоторые из этих белков могут служить в качестве маркеров процессов защиты нервной ткани в пенумбре.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-15-00068. Работа А.Б. Узденского поддержана грантом Минобразования России (Организация НИР № 790).

ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И СЕТЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ

Investigation of cellular and network mechanisms of neural tissue functioning for biomedical applications

Денисов А. А., Булай П. М., Молчанов П. Г., Питлик Т. Н., Черенкевич С. Н.

Белорусский государственный университет, 220030, Беларусь, Минск,
Тел.: +375296045780; e-mail: an.denisov@gmail.com

Задача исследования принципов функционирования головного мозга и основ функционирования биологических нейронных сетей привлекает внимание ученых не только благодаря ее фундаментальной значимости, но также из-за перспективных медицинских методов, возникающих на основе соответствующих научных и технологических разработок. Современные достижения в области исследования биологических нейронных сетей, применение электронных интерфейсов с нервными клетками, методов компьютерного моделирования и клеточных технологий открывают новые возможности для практического применения культивируемой нервной ткани в медицине и нейрофармакологии. Уникальным свойством нервной ткани является способность устанавливать коммуникации между клетками посредством передачи электрических импульсов и обрабатывать информацию в больших нейронных ансамблях. Соответственно, для получения знаний о механизмах функционирования нейронных ансамблей необходимо развитие соответствующих специализированных методов исследования. Нами разработан комплексный подход на основе интегрированной платформы, включающей методы компьютерного моделирования и высокотехнологичный электронный интерфейс с биологическими нейронами с целью создания системы для анализа и контроля клеточных, синаптических и сетевых процессов в нейронных ансамблях и тканях. Для изучения межнейронных взаимодействий на синаптическом уровне разработана автоматизированная электрофизиологическая установка для регистрации и стимуляции электрической активности нейронов в ткани головного мозга лабораторных животных *in vitro*. С ее помощью исследованы свойства конкурентных синаптических правил обучения в условиях многоканальной внеклеточной стимуляции в экспериментах со срезами гиппокампа крысы. Функциональные свойства соответствующих нейронных сетей были установлены с использованием компьютерных моделей, разработанных на основе полученных экспериментальных данных о параметрах синаптической пластичности в условиях внешней нейрохимической модуляции. Следующим шагом является расширение сферы исследований от отдельных нейронов и синаптических контактов до развивающихся сетей, сформированных из диссоциированных нейронов. Мы используем подход «open-source electrophysiology», чтобы обновить и трансформировать существующие решения в области многоканальной регистрации нейронной активности с целью создания автоматизированной системы анализа процессов обработки информации в нейронной сети, культивируемой на поверхности планарного микроэлектродного сенсора в условиях внешних воздействий. Разрабатываемая система также содержит модуль компьютерного моделирования биологических нейронных сетей для тестирования алгоритмов обучения и проведения предварительных вычислительных экспериментов с задачами обучения. Полученные знания о процессах обучения на уровне групп нейронов используются нами в экспериментальной работе с культивируемыми нейронами, полученными из стволовых клеток, с целью формирования функциональных нейронных сетей при разработке новых методов терапии на основе трансплантации нервной ткани.

Эта работа частично поддержана фондом «Science Around Us Foundation» (Лондон).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДУЛЯТОРОВ SK КАНАЛОВ НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ КОРЫ МОЗЖЕЧКА МЫШЕЙ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ SCA2-58Q *IN VIVO***The study of the SK channels modulators effect on electrophysiological activity of Purkinje cells in SCA2-58Q mice *in vivo******Егорова П.А., Безпрозванный И.Б.***

ФГАОУ ВО СПбПУ, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Тел.: +7(812) 297-20-95; факс: +7(812) 552-60-80; e-mail: office@spbstu.ru

Спиноцеребеллярная атаксия второго типа (СЦА2) представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызываемое увеличением полиглутаминового тракта в белке атаксин-2 с 22-х остатков глутамина в норме до 31-го и более в случае данного заболевания [1]. Заболевание СЦА2 сопровождается широким спектром клинических симптомов, таких как атаксия, офтальмоплегия, атрофия зрительных нервов, мышечная ригидность, пирамидные и экстрапирамидные расстройства [2]. До сих пор не существует единого мнения о патогенезе СЦА2. Аналогично атаксину-2 дикого типа, мутантный атаксин-2 обнаруживается во всех типах клеток, при этом формирования агрегатов и телец включения не наблюдается [3]. Однако, в случае СЦА2 пациентов, главным образом наблюдается поражение клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка и гибель более чем 75% этих нейронов на финальной стадии заболевания [2]. В настоящей работе были использованы мыши трансгенной линии SCA2-58Q, геном которых содержит вставку мутантного атаксина-2 с 58-ью остатками глутамина. Спонтанная активность КП была проанализирована в СЦА2 мышах и мышах дикого типа в возрасте 24-х, 36-ти и 48-ми недель с помощью метода внеклеточной регистрации электрофизиологической активности от одиночного отведения КП *in vivo*. Было выявлено, что количество КП с тонической активностью значительно выше ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) в случае мышей дикого типа по сравнению с СЦА2 мышами. Ранее было показано, что кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK каналы) играют ключевую роль в контроле пейсмейкерной активности КП [4]. В настоящей работе было продемонстрировано, что негативная фармакологическая модуляция SK каналов ингибитором NS8593 увеличивает частоту спонтанной активности КП и способствует генерации пачечной (50% случаев) и иррегулярной (36% случаев) активности КП лабораторных мышей *in vivo*. Данные результаты соотносятся с данными аналогичного эксперимента, проведённого на мышах линии C57BL/6 с помощью записи электрофизиологической активности *in vivo* дофаминергических нейронов чёрной субстанции [5]. Далее с использованием метода внеклеточной записи сигнала *in vivo* нами было показано, что активация SK каналов способствует нормализации активности КП в СЦА2 мышах. В наших экспериментах наблюдалось обращение пачечной активности КП СЦА2 мышей в тоническую в результате внутрибрюшинной инъекции активатора SK каналов хлорзоксазона. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что SK каналы представляют собой потенциальную мишень для терапевтического лечения СЦА2. Данная гипотеза была впервые проверена нами методами электрофизиологии *in vivo*.

1. Pulst S.M., Nechiporuk A. et al. / Nature Genetics, 1996. 14(3):269-276
2. Schöls L., Bauer P. et al. / Lancet Neurology, 2004. 3(5):291-304
3. Huynh D.P., Figueroa K. et al. / Nature Genetics, 2000. 26(1):44-50
4. Womack M.D., Khodakhah K. / The Journal of Neuroscience, 2003. 23(7):2600-2607
5. Herrik K.F., Christophersen P. et al. / Journal of Neurophysiology, 2010. 104(3):1726-1735

ВОЗМОЖНОСТИ НЕЙРОКОМПЬЮТИНГА В ОЦЕНКЕ НЕОПРЕДЕЛЁННОСТИ 1-ГО ТИПА

Capabilities of method of neurocomputing in evaluation of uncertainty of the 1st type

Еськов В.М., Филатова О.Е., Хадарцев А.А., Еськов В.В.

БУ ВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет», Россия, 628400, Сургут, пр. Ленина, д. 1

Тел.: +7(3462)763089; E-mail: kafedra_bin@mail.ru

Рассматриваются системы, которые нельзя относить к традиционным хаотическим системам, т.к. для них невозможно рассчитывать автокорреляционные функции, экспоненты Ляпунова, нет выполнения свойства перемешивания и непрерывно их вектор состояния $x(t)$ демонстрирует хаотическое движение в виде $dx/dt \neq 0$. Поскольку начальное состояние для $x(t_0)$ невозможно повторить произвольно для таких систем, то возникают неопределённости 1-го и 2-го типа. Для 1-го типа неопределённости характерно отсутствие статистически значимых различий между выборками, но в нейрокомпьютинге и теории хаоса-самоорганизации (ТХС) эти выборки чётко различаются [1,2]. На сегодня мы выделяем три типа неопределённости для complexity, и, в первую очередь, для кардиоинтервалов. Наиболее простая из них (первая) легче всего воспринимается сторонниками традиционного детерминистского и стохастического подходов, т.к. наиболее доступна для понимания. Возникает такая неопределённость в случае, когда стохастика показывает отсутствие различий между выборками, а методами теории хаоса-самоорганизации и нейрокомпьютинга различия между выборками чётко фиксируются.

При использовании нейро-ЭВМ становится очевидным, что все расчёты различий между выборками без должного числа итераций k в различных (и многочисленных) научных сообщениях других авторов, которые производились с помощью нейро-ЭВМ до настоящего времени в режиме небольшого числа итераций, ошибочны. Выводы о значимости диагностических признаков при $k < 100$ ошибочны уже в первом значении после запятой. Число итераций k необходимо делать как минимум $k=1000$. Любое разовое решение задачи бинарной классификации в биомедицинских исследованиях уникально и не представляет истинного значения W_i . Отметим, что сама процедура итераций требует использования многоядерных процессоров, т.к. в наших расчётах был использован Intel Xeon с 20-ю виртуальными ядрами и 16-ю ГБ оперативной памяти. Такая ЭВМ требовала не менее 3-4 часов для расчёта при $m \leq 7$. С увеличением размерности фазового пространства m время расчёта будет увеличиваться. Иными словами техника 90-х годов для таких вычислений была бы слабо эффективной и все публикации по использованию нейро-ЭВМ в медицине требуют пересмотра (если нет большого числа итераций) [1].

В рамках устранения неопределённости первого типа путём итераций решения задачи системного синтеза (идентификации параметров порядка) необходимо использовать нейро-эмуляторы в режиме бинарной классификации при числе итераций $k \geq 1000$. При этом мы устраняем неопределённость стохастических расчётов, т.к. выборки различаются и одновременно мы получаем ранжирование признаков x_i на основе анализа их весов (это тоже неопределённость, но она менее значима, чем выявление различий между стохастикой и нейрокомпьютингом). Сейчас одновременно мы производим и расчёт параметров квазиаттракторов, которые устраняют неопределённость и первого, и второго типа.

1. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Зимин М.И. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия. 2014. № 5. С. 41-46.
2. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Вохмина Ю.В. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия. 2015. № 2. С. 1.

ВЛИЯНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА И СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ КРЫСЫ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ**Change in the lipid composition and the state of somatic nerves membranes of rats in case of damage and under the action of hyaluronidase*****Исакина М.В., Ревина Э.С., Ревин В.В.***

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, 430032, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Ульянова, 26 б

Тел.: +7(8342)32-45-54; e-mail: mary.isakina@yandex.ru

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем является поиск возможных путей оптимизации аксональной регенерации. Использование биологически активных веществ, в частности гиалуроновой кислоты (ГК), представляется весьма перспективным направлением для посттравматической регенерации нервных проводников [1]. Кроме этого, известно, что гиалуроновая кислота расщепляется до коротких полисахаридных фрагментов под действием фермента – гиалуронидазы. Недавние исследования продемонстрировали, что эти фрагменты могут участвовать в регуляции метаболизма на клеточном уровне [2]. В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение влияния гиалуронидазы на изменение липидного состава и состояния клеточных мембран при патологии периферических нервов. У наркотизированных животных одной группы перевязывали один из седалищных нервов, после чего рану зашивали, а другой нерв оставляли без изменений (контроль). У животных второй группы после перевязки нерва в область бедра через день вводили раствор гиалуронидазы (10 ЕД/мл). Животных обеих групп выводили из эксперимента через 5, 10 и 30 суток и анализировали жирнокислотный состав общей фракции фосфолипидов (ФЛ), фракций свободных жирных кислот (СЖК) и диацилглицерола. Состав фосфолипидов анализировали методом одномерной хроматографии в системе растворителей хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4). Количественное определение фосфолипидов осуществляли с помощью денситометрического автоматизированного комплекса CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Для разделения СЖК и ДАГ использовали систему гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (60:40:1) Для определения интенсивности флуоресценции нервных проводников использовался метод оптического имиджинга на основе системы визуализации IVIS[®] Luminall.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что использование гиалуронидазы при повреждении периферических нервов приводит к изменениям в жирнокислотном составе отдельных липидных фракций. Наиболее заметные изменения наблюдаются на 30-е сутки эксперимента. Так, коэффициент насыщенности во фракциях свободных жирных кислот, диацилглицерина и общей фракции фосфолипидов снижается на 87,1, 57,1 и 45,1% соответственно относительно серии опытов с повреждением. В этих же условиях интенсивность флуоресценции возрастает в 2,2 раза, что свидетельствует об активации окислительных процессов, приводящих к усилению дегенерации нервного волокна.

Из полученных данных можно заключить, что использование данного фермента в качестве разрушающего агента внеклеточного матрикса не способствует нормализации количественного и качественного состава жирных кислот и восстановлению структуры мембран нервных проводников.

1. Рахматуллин Р., Бурлуцкая О и др. / Врач, 2011. №5. С. 22–24.
2. Torigoe K., Tanaka H.F. et al. / Brain research, 2011. №1385. P. 87–92.

ВЛИЯНИЕ ГИАЛУРОНАТА КАЛИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА В ПРОКСИМАЛЬНОМ И ДИСТАЛЬНОМ ОТРЕЗКАХ НЕРВНОГО ПРОВОДНИКА

Influence of potassium hyaluronate on the change of lipid composition in proximal and distal end of the nerve conductor

Исакина М.В.1, Ревина Н.В.1, Ревин В.В.1

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, 430032, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Ульянова, 26 б

Тел.: +7(8342)32-45-54; e-mail: mary.isakina@yandex.ru

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме восстановления функций поврежденных периферических нервов. Одним из перспективных веществ, используемых в восстановительной хирургии и тканевой инженерии, является гиалуроновая кислота [1]. Ускоряя регенеративные процессы, она способствует восстановлению свойств клеточных мембран, одним из основных компонентов которых являются липиды [2]. Тем не менее, при повреждении нерва его центральный и периферический отрезки претерпевают различные изменения. В связи с этим, целью нашей работы было исследование влияния гиалуроната калия (ГК) на изменение липидного состава в каждом из отрезков поврежденного нервного волокна. У наркотизированных животных одной группы перерезали один из седалищных нервов, а другой нерв оставляли без изменений (контроль). У животных второй группы на проксимальный и дистальный концы перерезанных нервов наносили раствор ГК в концентрациях 2 мг/кг, 17 мг/кг и 30 мг/кг. Животных обеих групп выводили из эксперимента через 12 ч., 1 сут., 3 сут., 7 сут. и 30 сут. и анализировали изменение содержания лизофосфолипидов (ЛФЛ) и свободных жирных кислот (СЖК). Для разделения ЛФЛ и СЖК использовали системы растворителей хлороформ/метанол/аммиак/вода (65:30:4:2) и гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (60:40:1) соответственно. Количественное определение ЛФЛ осуществляли денситометрическим методом на автоматизированном комплексе CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Эксперимент показал, что к 7-м суткам наблюдения уровень ЛФЛ в дистальном конце нерва возрастает в 12 раз относительно контроля. В отличие от дистального конца, в проксимальном отрезке в этих же условиях отмечается тенденция к снижению содержания ЛФЛ, а превышение над уровнем контроля соответствует 34%. Во фракции СЖК прослеживается аналогичная динамика. В ходе исследования было установлено, что достоверное снижение уровня ЛФЛ происходит при использовании ГК в концентрации 30 мг/кг на более длительных сроках от начала перерезки. Показано, что в дистальном конце нерва ГК оказывал больший положительный эффект по сравнению с его проксимальным отрезком и вызывал снижение количества ЛФЛ и СЖК к 7-м суткам эксперимента в среднем в 2 раза относительно повреждения.

Таким образом, ГК оказывает свое стабилизирующее действие на восстановление уровня ЛФЛ и СЖК в дистальном конце нерва в большей степени. Вероятно, что различное действие ГК на дистальный и проксимальный участки нерва связано с тем, что в проксимальном отрезке сохраняется связь с центральной нервной системой, и за счет существования компенсаторных механизмов дегенерационные процессы в липидной фазе соматических нервов протекают менее интенсивно.

1. Collins M. N., Birkinshaw C. et al. / Carbohydrate Polymers, 2013. №92. P. 1262-1279.
2. Torigoe K., Tanaka H.F. et al. / Brain research, 2011. №1385. P. 87-92.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КАЛЬЦИЙ АКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА К ДЕЙСТВИЮ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ NS309 И CyPPA**Age-related dynamics of cerebellar Purkinje cells calcium-activated potassium channels to effect of positive modulators NS309 and CyPPA****Карелина Т.В., Степаненко Ю.Д., Абушик П.А., Сибаров Д.А., Антонов С.М.**

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза 44.

Тел.: +7(812)552-85-54; факс: +7(812)552-30-12; e-mail: Karelina_tanja@mail.ru

Кальций-активируемые калиевые каналы играют важную роль в регулировании возбудимости нейронов. В клетках Пуркинье (КП) мозжечка они вносят непосредственный вклад в формирование пейсмекерной активности. Как известно, крысы – незрелорождающие животные и формирование различных структур ЦНС продолжается у них в постнатальном онтогенезе. Старение является завершающим этапом развития организма и сопровождается изменением активности всех его функциональных систем, в основе которых лежит возбудимость нейронов. Целью исследования было изучение работы кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости (SK) в коре мозжечка крыс, находящихся на разных этапах онтогенетического развития.

Опыты проводились в условиях *in vivo* на наркотизированных уретаном крысах линии Wistar обоего пола трех возрастных групп – 2 недели (молодые), 3-6 мес (взрослые) и 22-28 мес (старые), используя метод внеклеточной микроэлектродной регистрации нейронной активности. Для оценки функционального состояния SK каналов определяли изменение частоты простых спайков в разряде КП мозжечка под влиянием двух положительных модуляторов SK каналов – NS309, который действует на все 3 подтипа SK каналов и на каналы промежуточной проводимости, а также CyPPA, который активирует только SK каналы. Действующие вещества апплицировались на обнаженную поверхность мозжечка в области введения микроэлектрода в концентрации от 100 до 200 мкМ для NS309 и от 1 до 2 мМ для CyPPA. В качестве контроля использовали аппликацию физиологического раствора.

Аппликация обоих модуляторов SK каналов приводила к изменению паттерна активности КП мозжечка в виде снижения частоты простых спайков во всех трех возрастных группах крыс, однако уровень этих изменений был различен для каждого возраста. Наиболее сильное изменение паттерна активности КП наблюдалось у молодых крысят. У них частота простых спайков снизилась на $44,5 \pm 5,6\%$ при аппликации NS309 и на $39,1 \pm 6,6\%$ при аппликации CyPPA по отношению к исходному уровню. В группе взрослых крыс снижение было меньше, чем у крысят и составило $28,6 \pm 4,4\%$ и $29,9 \pm 8,0\%$, соответственно для NS309 и CyPPA. У старых крыс снижение частоты простых спайков в разряде КП при аппликации NS 309 было практически таким же, как и у взрослых животных и составило $28,0 \pm 3,9\%$, а при применении CyPPA этот показатель был наименьшим из всех трех возрастных групп и составил $19,7 \pm 4,1\%$.

Полученные данные позволяют предположить, что имеются количественные различия в регуляторной функции кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости крыс разных возрастов. Учитывая тот факт, что применение положительных модуляторов SK каналов приводит к восстановлению нарушенного паттерна активности КП, а также и к исчезновению симптомов некоторых видов атаксий, то полученные нами данные предполагают разработку различных подходов к лечению атаксии с учетом возрастного фактора.

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-00227, 14-04-31707 и 15-04-08283.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЕЙ И С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

Information approach to the analysis of bioelectric signals of the brain at patients with ischemia and with diabetic encephalopathy

Кижеватова Е.А., Омельченко В.П.

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Тел.: +7(918)5480420, e-mail: alyonatim@mail.ru , e-mail: vitally.omelchenko@mail.ru

Интерес к исследованиям биоэлектрической активности головного мозга с каждым годом стремительно увеличивается, как и возрастает внимание к изучению нарушений его когнитивных функций. В настоящее время при диагностировании энцефалопатии и при установлении наличия когнитивных нарушений у пациентов врачам зачастую приходится прибегать к дифференциальной диагностике дисциркуляторной энцефалопатии, диабетической энцефалопатии и мнестических расстройств другой этиологии, используя дополнительные методы диагностики.

Таким образом, цель данного исследования – демонстрация возможностей современных информационных технологий в нейрофизиологии. А также повышение информативности электроэнцефалографического исследования у больных с диабетической и дисциркуляторной энцефалопатиями.

Исследование проводили на базе кафедры «медицинской и биологической физики» РостГМУ при помощи прибора «Энцефалан-131-03» (г. Таганрог), обработку данных осуществляли при помощи программ Statistica 6.0 и Excel 2007. В исследовании приняли участие 90 человек: группа больных с диабетической энцефалопатией (30 человек), группа больных с дисциркуляторной энцефалопатией (30) человек и контрольная группа здоровых лиц (30) человек. Средний возраст испытуемых 50-60 лет.

Всем испытуемым проводили психологическое тестирование, им предлагались когнитивные задачи и проводили ЭЭГ-исследование. ЭЭГ анализировали при помощи спектрального анализа и дискриминантного пошагового анализа.

По результатам исследования были созданы дискриминантные функции для каждой группы, благодаря которым стало возможно проводить дифференциацию пациентов в зависимости от полученных характеристик их ЭЭГ, были построены матрицы классификации с чувствительностью 92%.

Предлагаемый способ позволяет повысить точность дифференциальной диагностики сосудистых и других когнитивных расстройств и улучшить результаты их ранней диагностики при минимальном объеме параклинических методов исследований. Полученные результаты при условии расширения эксперимента могут быть дополнены и служить одним из диагностических критериев когнитивного здоровья.

1. Омельченко В.П., Тимошенко Е.А. Применение дискриминантного анализа для классификации ЭЭГ больных диабетической энцефалопатией // Инженерный вестник Дона. 2012. Т. 22. № 4-1 (22). С. 16
2. Цыган, В.Н. Электроэнцефалография / В.Н. Цыган, М.М. Боголовский, А.В. Миролубов; под ред. М.М. Дьяконова. – СПб.: «Наука», 2008. – 19-23 с.

СТОХАСТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЛУТАМАТНОГО ПЕРЕНОСЧИКА В НЕЙРОНАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**Stochastic Modeling of Mammalian Neuronal Glutamate Transporter*****Кофанова О.А., Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р.***НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Москва, 6-ая Радиальная, 24, стр. 14.
Тел./Факс.: +7 (495) 347-49-87; olga.kofanova@gmail.com

Мембранные глутаматные переносчики экспрессируются во многих тканях млекопитающих, но наибольшее значение имеют в нейронах головного мозга. Они играют важную роль в глутаматэргической нейротрансмиссии, очищая межсинаптическое пространство от нейромедиатора, и предупреждают эксайтотоксическое действие глутамата на нейроны. Существует 5 видов переносчиков глутамата, так называемых транспортеров возбуждающей аминокислоты (Excitatory Amino Acid Transporters 1-5, EAAT 1-5), все они принадлежат к 1 семейству переносчиков растворимых веществ (solute carrier 1 family – SLC1) и обладают общей стехиометрией, суммарно перемещая в каждом транспортном цикле два положительных заряда внутрь клетки, поэтому процесс переноса считается электрогенным. Оптимальная глутаматэргическая нейротрансмиссия, как и поддержание концентрации глутамата на физиологическом уровне важны для нормального протекания большинства процессов ЦНС, таких как сознание, память, обучение, процессы установления и выключения синаптических контактов, а также для клеточной миграции, дифференцировки и гибели. Поэтому нарушение функционирования или уменьшение числа мембранных глутаматных переносчиков приводит к различным расстройствам и патологиям ЦНС [1].

Для рассмотрения кинетических свойств единичного переносчика глутамата в нейронах был предложен алгоритм стохастического моделирования, основанный на коэффициентах вероятности каждого элементарного шага транспортного цикла, будь то связывание субстрата или перемещение его через мембрану. Структурные особенности белка косвенно выражаются в величинах коэффициентов вероятности, которые в общем случае вычисляются из констант равновесия каждой элементарной реакции (шага) или из разницы свободных энергий связывания субстрата. Временные параметры шагов могут задаваться независимо. Такой подход позволяет изменять последовательность элементарных событий, что дает возможность рассматривать различные схемы транспортного цикла белка. Также, виртуальные компьютерные эксперименты можно проводить при различных внешних условиях, например, концентрациях субстрата. Кроме всего прочего, данный подход позволяет получить детальную информацию о функционировании мембранного глутаматного переносчика в достаточно короткие сроки, что является его важным преимуществом перед многими другими.

1. Кофанова О.А., Нарциссов Я.Р. / Практическая медицина. Неврология. Психиатрия, 2014. №2 (78). С.150-154.

ЭВОЛЮЦИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ НЕЙРОНОВ

The evolution of mathematical models of neurons

Мазуров М.Е.

МГУЭСИ, Москва, Нежинская ул., д.7; mazurov37@mail.ru

Данная работа является обзором известных в настоящее время математических моделей нейронов. Это следующие математические модели [1,2]: 1) формальные аксиоматические модели; 2) модели динамических нейронов; 3) модели импульсных или спайковых нейронов; 4) другие модели. Приведены данные о наиболее известных аксиоматических математических моделях нейронов с указанием времени создания: 1. Нейрон МакКаллока-Питса (1943); 2. Нейрон Винера-Розенблюта (1946); 3. Нейрон Хебба (1949); 4. Звезды Гроссберга С. (1969); 5. Нейрон Маркина В.С. и др. (1981); 6. Нейроны типа WTA Липпмана Р., Хемминга (1987); 7. Радиальный нейрон; 8. Стохастический нейрон; 9. Нейрон Ижикевича Е. М. (2003); 10. Блокинг-релаксационный нейрон Мазурова М.Е. (2007); 11. Бионический нейрон Вяльцева В.Б. (2008).

Математические модели импульсных нейронов, описываемые нелинейными дифференциальными уравнениями. Математические модели этого типа включают две системы. Первая система описывает возбуждение импульса или последовательности импульсов. Вторая система описывает механизмы синаптической передачи. Модели для возбуждения импульса или последовательности импульсов представляют собой так называемые системы кинетических уравнений. Базовая модель кинетических уравнений – уравнение Ходжкина-Хаксли. Другой тип уравнения возбуждения импульсов представляет модификация уравнения Ван дер Поля. Примером таких уравнений являются уравнения Ижикевича, двумерная и трехмерная системы Хиндмарша–Розе, блокинг-релаксационный нейрон Мазурова М. Е. и др. Приведены систематические данные о наиболее известных математических моделях импульсных нейронов с указанием времени создания: 1. Нейрон Лапика Lapicque M.L. (1907); 2. Нейрон МакКаллока-Питса с возбуждением импульса или последовательности импульсов (1943); 3. Нейрон Ван дер Поля модифицированный; 4. Нейрон Ходжкина - Хаксли Hodgkin A.L., Huxley A.F. (1952); 5. Нейрон Ван дер Поля – Фитцхью (1961); 6. Нейрон Маркина В.С. и др. (1981); 7. Нейрон Моррис-Лекара Morris C., Lecar H. (1981); 8. Двумерная и трехмерная системы Хиндмарша–Розе Hindmarsh J.L., Rose R.M. (1982); 9. Нейрон Ижикевича Е. М. (2003); 10. Нейрон Хубера-Брауна (2003); 11. Нейрон Некоркина В. И. и др. (2005); 12. Блокинг-релаксационный нейрон Мазурова М. Е. (2007). Рассмотрены математические модели синаптической передачи. Моделей синаптической передачи (как химической, так и электрической) значительно меньше, чем моделей нейронов. Рассмотрены более подробно: феноменологические модели химической синаптической передачи; детальные модели химической синаптической передачи; синаптическая пластичность. Дано описание математической модели нейрона типа мемристор, в котором напряжение пропорционально интегралу от приложенного электрического заряда. В последнее время разработан нейрон с избирательными свойствами. Паттерны каждого объекта имеют специфическую структуру или векторную организацию их возбужденных и невозбужденных частей – локусы. Нейрон не имеет весового взвешивания коэффициентов. Он является материализованной структурой векторной теории восприятия Соколова Е.Н.

1. Александров Ю.И., Анохин К.В., Соколов Е.Н., Греченко Т.Н. и др. Нейрон. Обработка сигналов. Пластичность. Моделирование. Фундаментальное руководство //Изд-во Тюменского государственного университета. 2008 . 548 с.
2. Мазуров М. Е. Идентификация математических моделей нелинейных динамических систем // М.: – Ижевск. РХД. 2008. 284 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РЕАЛИЗАЦИИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИНА (N-ADA) ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОСТРОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ IN VITRO**The role of cannabinoids receptors in N-arachidonoyldopamine's neuroprotective effects during the acute hypoxic conditions in vitro*****Митрошина Е.В. 1,2, Ведунова М.В.2,1, Мищенко Т.А.1,2, Мухина И.В.1,2***

1 – ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

2 – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950, Тел.: +7(831)465-46-43; факс: +7(831)465-42-81; e-mail: Helenmitroshina@gmail.com

Гипоксия – ключевой фактор повреждения клеток головного мозга при ишемическом инсульте. Эффективных способов предотвращения вызванных гипоксией повреждений нервных клеток пока не разработано. В нейробиологии активно исследуется роль эндогенных соединений в защите клеток головного мозга при кислородной депривации. Мы изучали роль каннабиноидных рецепторов в нейропротекторном эффекте синтетического аналога эндоканнабиноида N-арахидоноилдофамина (N-ADA), оказываемого им на функциональную активность и выживаемость клеток первичных культур гиппокампа при моделировании острой гипоксии *in vitro*. Материалом для исследований явились культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Клетки культивировались на мультиэлектродных матрицах и покровных стеклах. Моделирование острой нормобарической гипоксии проводилось после 14 дня развития *in vitro* путем замены нормоксической культуральной среды на среду с концентрацией кислорода не более 0,53 мг/л в течение 10 минут. Функциональную активность нейронных сетей первичных культур гиппокампа изучали с помощью мультиэлектродной системы MEA60 и функционального кальциевого имиджинга с применением Ca^{2+} -чувствительного красителя Oregon Green и конфокальной микроскопии. Для оценки уровня экспрессии мРНК каннабиноидных рецепторов 1 типа использовали прижизненную детекцию мРНК с помощью РНК-зондов SmartFlare, для оценки распределения CB1 – иммуноцитохимическое окрашивание. Оказалось, что острая нормобарическая гипоксия снижает функциональную активность первичных культур клеток гиппокампа, необратимо уменьшая количество сетевых пачек и количество спайков в них в постгипоксическом периоде. На 7 сутки биоэлектрическая активность в культурах гиппокампа не регистрируется. Число клеток, проявляющих спонтанную Ca^{2+} активность, после моделирования гипоксии достоверно снизилось (с $72 \pm 6,5$ до $18 \pm 8,4\%$ клеток). Аппликация N-ADA (10 мкмоль) во время гипоксии и в первые сутки постгипоксического периода препятствует необратимым изменениям нейросетевой биоэлектрической и Ca^{2+} активности в течение как минимум 7 суток после острого гипоксического воздействия. При изучении молекулярных механизмов антигипоксического и нейропротекторного действия с помощью селективной блокады каннабиноидных рецепторов 1 и 2 типов (CB1 и CB2) выявлено, что нейропротекторное действие N-ADA опосредуется через каннабиноидные рецепторы 1 типа, а активация каннабиноидных рецепторов 2 типа оказывает менее выраженный нейропротекторный эффект. Изучение уровня экспрессии мРНК CB1 рецепторов нейротрофического фактора показало, что аппликация N-ADA не приводит к активации синтеза мРНК CB1. Гипоксия снижала размеры кластеров CB1 рецепторов, а аппликация N-арахидоноилдофамина при моделировании гипобарической гипоксии сохраняла их. Итак, эндогенное соединение N-ADA повышает устойчивость нейронов гиппокампа к гипоксии.

Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, 15-29-04908

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ГОЛОВНОГО МОЗГА (BDNF)
В АНТИГИПОКСИЧЕСКИХ И РЕПАРАТИВНЫХ МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ПРИ ОСТРОМ
ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Brain-derived neurotrophic factor's involvement in antihypoxic and reparative mechanisms in neural networks during the acute hypoxic conditions

Мищенко Т.А.1,2, Ведунова М.В.2,1, Шишкина Т.В. 2,1, Митрошина Е.В. 1,2, Мухина И.В.1,2

1 – ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, 603005, Нижний Новгород,

2 – ФГАОУ ВО Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Нижний Новгород, 603950

Тел.: +7(831)465-46-43; факс: +7(831)465-42-81; e-mail: saHarnova87@mail.ru

В настоящее время в нейробиологии активно исследуется роль эндогенных регуляторных молекул в защите клеток нервной системы от гипоксии. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) – один из компонентов эндогенной антигипоксической и нейропротекторной систем головного мозга. Целью нашего исследования было изучить молекулярные внутриклеточные механизмы действия BDNF в условиях кислородного голодания и его роль в системе функциональной репарации. Материалом для исследований служили культуры диссоциированных клеток гиппокампа, полученные от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Клетки культивировались на мультиэлектродных матрицах MED64 (Alfa Med Science, Япония) и покровных стеклах. Моделирование острой нормобарической гипоксии проводилось после 14 дня развития *in vitro* путем замены нормоксической культуральной среды на среду с концентрацией кислорода не более 0,53 мг/л в течение 10 минут. Апликация BDNF (1 нг/мл) осуществлялась за 20 минут до моделирования гипоксии. При исследовании репаративных свойств, BDNF добавляли в среду культивирования ежедневно, начиная с третьего дня постгипоксического периода. Для изучения функциональной сетевой биоэлектрической активности исследовались следующие параметры: количество пачек, количество спайков в пачке. Кроме того, оценивалась жизнеспособность клеточных культур, а также уровень экспрессии мРНК NF- κ B и GluR2 с использованием РНК-зондов (SmartFlare, Merck Millipore). Оказалось, что острая нормобарическая гипоксия вызывает необратимые изменения показателей функциональной активности первичных культур клеток гиппокампа, проявляющиеся в снижении количества сетевых пачек и количества спайков в пачке. Кроме того, жизнеспособность клеток достоверно ($p < 0,05$) снизилась на 43%. Превентивное введение BDNF (1 нг/мл) препятствовало деструкции сетевой пачечной активности и увеличению количества мертвых клеток. При изучении возможных молекулярных механизмов антигипоксического и нейропротекторного действия нейротрофического фактора показано, что апликация BDNF не приводит к активации синтеза как мРНК NF κ B1, так и мРНК субъединицы AMPA-рецепторов GluR2. Курс хронического добавления в культуральную среду BDNF (1 нг/мл) начиная с третьего дня постгипоксического периода приводил к частичному восстановлению спонтанной биоэлектрической активности первичных гиппокампальных культур. Наблюдалась не только стабилизация деградирующей функциональной активности, но и увеличение спонтанной сетевой активности. Итак, нейротрофический фактор BDNF может рассматриваться как эффективный метаболический агент, обладающий не только защитным, но и репаративным действием в условиях гипоксического повреждения клеток головного мозга.

Работа поддержана грантами РФФИ № 13-04-01871, №13-04-12067, №14-04-31601, 15-29-04908 и «Обеспечение проведения научных исследований».

АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ ПАРНОГО ОТНОШЕНИЯ РЕАКЦИЙ НЕЙРОНОВ ОТ МЕЖСТИМУЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА**Analysis of dependence of pair neuron relations of responses from an interstimul interval*****Мурзина Г.Б.1, Пивоваров А.С.2, Махновский Д.А.2***

1 – Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва

2 – МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Ленинские горы,

e-mail: gbmurzina@mail.ru

При изучении механизмов депрессии чувствительности к ацетилхолину (АХ) командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки на клеточном аналоге привыкания отдельно была получена зависимость (I) парного отношения амплитуды входящего трансмембранного АХ-тока этих нейронов в ответ на второй (тестирующий) стимул по отношению к амплитуде АХ-тока в ответ на первый (кондиционирующий) стимул при парных аппликациях АХ от величины интервала между стимулами в паре. Это исследование было сделано с целью определения минимального межстимульного интервала, при котором парное отношение близко к 1. Интервал между стимулами (t) варьировал от 10 до 600 секунд. Оказалось, что первоначальное уменьшение $I(t)$ при изменении t от 10 с до 40 с сменяется его монотонным ростом до 100% при значениях t более 40 с. Поведение кривой $I(t)$ парного отношения при $t > 300$ с соответствует существующим экспериментальным данным по выработке депрессии, согласно которым депрессия холиночувствительности мембраны не возникает, если интервал времени между последовательными аппликациями АХ на сому нейрона превышает 5 минут. Объяснение зависимости величины депрессии вызванного АХ-тока в ответ на тестирующий стимул при парной стимуляции от величины межстимульного интервала было осуществлено с помощью математической модели, которая учитывала мембранное и внутриклеточное расположение рецепторов, их латеральную диффузию и зависящие от внутриклеточных процессов эндоцитоз и экзоцитоз рецепторов (ЭНР и ЭкР) [2]. В модели полагалось, что амплитуда АХ-тока зависит от количества мембранных рецепторов и концентрации апплицируемого медиатора. Оставались невыясненными процессы, определяющие наличие “минимального” значения $I(t)=54\%$ при межстимульном интервале $t=40$ с, начиная с которого наблюдается возрастание $I(t)$. Аналитическое решение системы дифференциальных уравнений показало, что при отсутствии латеральной диффузии рецепторов и изменении параметров (в случае их независимости от внутриклеточных веществ), моделирующих ЭНР и ЭкР, происходит монотонный двухэкспоненциальный переход к новой концентрации рецепторов на мембране. Применение математической модели, параметры которой не являются постоянными (поскольку, ЭНР и ЭкР зависят от внутриклеточного рецепторного транспорта, позволяет получить кривую, аналогичную экспериментальной $I(t)$. Зависимость параметров от внутриклеточных процессов отражает экспериментальные данные, согласно которым при аппликации медиатора происходит активация ряда внутриклеточных веществ, влияющих на скорость внутриклеточного рецепторного транспорта. Поэтому после подачи медиатора происходит изменение скоростей ЭНР и ЭкР. Таким образом, существование “минимального” значения $I(t)$ является следствием этой зависимости. Наличие латеральной диффузии рецепторов будет приводить к уменьшению как значения межстимульного интервала, так и амплитуды “минимума” АХ-тока на тестирующий стимул. Следовательно, у нейронов, находящихся в разных состояниях при воздействии на них веществ, приводящих к изменению активности внутриклеточных процессов или вязкости мембраны, кривые парного отношения реакций могут различаться и наибольшая депрессия при парной стимуляции будет наблюдаться при разных значениях межстимульного интервала, ее амплитуда также будет переменной.

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИЗОПРОПИЛНОРАДРЕНАЛИНА И ПРОПРАНОЛОЛА НА АКТИВНОСТЬ АЛЬФА-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МЕМБРАН КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Modulating influence of isoprenaline and propranolol on the alpha-adrenoceptors activity in rat brain cortex membranes

Нестерова Л.А. 1, Манухин Б.Н.1

Учреждение Российской Академии Наук, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

Тел. +7(499) 135-55-07, E-mail: nesterovala@idbras.ru

На субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс исследовано влияние активации и ингибирования β -адренорецепторов изопрропилнорадреналином и пропранололом на связывание специфических неселективных антагонистов α_1 - и α_2 -адренорецепторов [3 H]празозина и [3 H]RX821002. Установлено, что для α_1 - и α_2 -адренорецепторов лиганд-рецепторное взаимодействие соответствует модели: один по аффинности пул рецепторов и присоединение двух молекул лиганда к одному димерному рецептору. Параметры связывания [3 H]празозина – $K_d=1.85\pm 0.16$ нМ, $B_{max}=31.14\pm 0.35$ фмоль/мг белка, $n=2$. Параметры связывания [3 H]RX821002 – $K_d=1.57\pm 0.27$ нМ, $B_{max}=7.24\pm 1.63$ фмоль/мг белка, $n=2$. При активации β -адренорецепторов изопрропилнорадреналином связывание радиоактивных лигандов с α_1 - и α_2 -адренорецепторами происходит по такой же модели. Чувствительность к [3 H]празозину и количество активных α_1 -адренорецепторов увеличивается на 27% ($K_d = 1.36\pm 0.03$ нМ), и 84% ($B_{max} = 57.37\pm 0.28$ фмоль/мг белка) соответственно. Чувствительность α_2 -адренорецепторов к [3 H]RX821002 снижается на 56% ($K_d = 3.55\pm 0.02$ нМ), а концентрация активных адренорецепторов увеличивается на 69% ($B_{max} = 12.24\pm 0.06$ фмоль/мг белка). Пропранолол влияет на характер связывания обоих лигандов. Для [3 H]празозина и [3 H]RX821002 определяются два пула рецепторов с параметрами $K_{d1}=1.13\pm 0.09$, $K_{d2} = 6.07\pm 1.06$ нМ, $B_{m1} = 11.36\pm 1.77$, $B_{m2} = 51.09\pm 0.41$ фмоль/мг белка, $n=2$ и $K_{d1}=0.61\pm 0.02$, $K_{d2} = 3.41\pm 0.13$ нМ, $B_{m1} = 1.88\pm 0.03$, $B_{m2} = 9.27\pm 0.08$ фмоль/мг белка, $n=2$ соответственно. Концентрация активных рецепторов (B_{max}) возрастает в два раза для обоих лигандов. Предполагается, что α_1 - и α_2 -адренорецепторы в субклеточных фракциях мембран коры головного мозга крыс существуют в виде димеров. Выявлено модулирующее действие изопрропилнорадреналина и пропранолола на связывание специфических антагонистов α_1 - и α_2 -адренорецепторами, которое проявляется в активирующем эффекте на параметры связывания [3 H]празозина и ингибиторном эффекте на параметры связывания [3 H]RX821002 и изменении общего характера связывания обоих лигандов. Приведенные данные свидетельствуют о с взаимодействии нейротрансмиттерных систем. Для радиолигандных экспериментов оно более вероятно на уровне мембраны клетки. Можно предположить, что присоединение нейротрансмиттера к своему рецептору изменяет активность других рецепторов, модулируя специфические реакции клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00845

РОЛЬ БЕЛКА STIM2 В РЕГУЛЯЦИИ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ В УСЛОВИЯХ АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ**Role of STIM2 protein in synapse regulation in conditions of amyloid toxicity**

Пчицкая Е.И. 1, Попугаева Е.А. 1, Власова О.Л. 1, Безпрозванный И.Б. 1,2

1 – Лаборатория молекулярной нейродегенерации, Кафедра «Медицинская физика», Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Россия

2 – Кафедра физиологии, Юго-Западный Медицинский Центр Университета Штата Техас, TX 75390, Даллас, США

Болезнь Альцгеймера (БА) является самой распространенной формой деменции в мире, и число больных продолжает расти ежедневно. На данный момент эффективная терапия БА отсутствует и имеется острая необходимость в поиске новых терапевтических мишеней.

В недавнем исследовании нашей лаборатории было продемонстрировано, что в нокиновой мышинной модели БА (PC1-M146V-KI), несущей мутацию M146V в белке Пресенилин 1, происходит потеря грибовидных шипиков из-за сниженного постсинаптического нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВС) [1]. Экспрессия ключевого участника нДУВС белка STIM2, но не его гомолога STIM1, снижается в гиппокампе нокиновых мышей. Более того, мы показали, что гиперэкспрессия белка STIM2 восстанавливает синаптический нДУВС и грибовидные шипики в нокиновой модели БА [1]. Тем не менее, мыши линии PC1-M146V-KI не экспрессируют человеческий белок предшественник амилоида и, соответственно, не формируют человеческие A β , которые в доминирующей на данный момент “амилоидной гипотезе” считаются токсичными для нейронов образованиями, ответственными за возникновение БА. Исходя из сказанного выше, возникает вопрос: выполняет ли путь STIM2-нДУВС схожую роль в условиях амилоидной токсичности? В данном исследовании была использована модель низкой амилоидной токсичности, так как, по нашему мнению, она соответствует начальным стадиям БА, когда терапия будет наиболее эффективна. Мы обнаружили снижение экспрессии белка STIM2, а также уменьшение процента грибовидных шипиков, в условиях низкой амилоидной токсичности *in vivo* и *in vitro*. Мы показали, что гиперэкспрессия STIM2 способна восстановить процент грибовидных шипиков. Таким образом, гиперэкспрессия STIM2 способна защитить нейроны от токсичного действия A β [2].

Суммируя вышесказанное, мы предполагаем, что нормальное функционирование пути STIM2-нДУВС необходимо для поддержания структуры грибовидного шипика и его снижение является чертой патогенеза БА [3]. Активаторы пути STIM2-нДУВС являются потенциальными терапевтическими агентами для лечения БА.

Данная работа поддерживается грантом Российского Научного Фонда №14-25-00024 (Безпрозванный И.Б.) и грантом из частного фонда Династия DP-B-11-14 (Попугаева Е.А.).

1. Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N.J., Feske S., et al., /Neuron, 2014. 82(1): p. 79-93.
Popugaeva E., Pchitckaia E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I., / Molecular Neurodegeneration, 2015. 10: p. 37.
2. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zaharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I., / J Neurosci. 2015. in press. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1034-15.2015

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИКИ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ НА ОЦЕНКУ ДИАМЕТРА ПОРЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ

The influence of side chains dynamics on the measurement of pore diameter of the ion channels

Россохин А.В.

Научный Центр Неврологии, 105064, Москва, пер. Обуха 5 *e-mail*: alrossokhin@yahoo.com

Электрические сигналы нервных клеток опосредованы потоком ионов через специфические каналы клеточной мембраны. Ионные каналы являются интегрированными в мембрану белками, в структуре которых имеется водопроницаемая пора, обеспечивающая транспорт ионов через гидрофобный барьер мембраны. Большинство ионных каналов переходят в открытое состояние при изменении потенциала на мембране или при связывании специфической молекулы лиганда.

Проницаемость открытого канала для ионов и молекул блокаторов/модуляторов, связывающихся в пору, зависит от площади ее поперечного сечения, которая обычно определяется только в статических белковых структурах. В этой работе мы исследовали, на примере рецептора γ -аминомасляной кислоты типа А (ГАМК_AР), как диаметр поры зависит от конформации боковых цепей аминокислотных остатков, образующих стенки поры. Для этого мы построили гомологические модели ГАМК_AР на основе электронно-микроскопической структуры никотинового ацетилхолинового рецептора и рентгеновской структуры глутамат-управляемого хлорного канала. Мы использовали метод Монте-Карло минимизации энергии, чтобы определить насколько диаметр поры может увеличиваться в результате отталкивания гибких боковых цепей от электронейтрального атома переменного диаметра, который протягивали вдоль оси поры. Наши расчеты показали, что диаметр поры, определенный в статической структуре ГАМК_AР, является существенно недооцененным. В среднем по всей длине поры различие динамической и статической оценок составляет ~ 60%.

ГАМК_AР являются мишенью для эндогенных и экзогенных блокаторов и модуляторов, многие из которых связываются в пору канала. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют, что неконкурентные блокаторы пенициллин, пикротоксинин, EBOB, TBPS, BIDN, инсектициды (α -эндосульфат, линдан, фипронил), обладающие различной химической структурой, связываются в районе цитоплазматического вестибюля поры. Мы показали, что поперечный размер молекулы пикротоксинина превосходит на нескольких уровнях глубины поры диаметр, определенный в статической структуре ГАМК_AР, делая невозможным достижение блокатором своего сайта связывания. Диаметр, определенный с учетом динамики боковых цепей выстилающих пору остатков, позволяет пикротоксинину достичь своего сайта связывания. Таким образом, корректная оценка размеров поры позволяет предсказать доступность специфического сайта связывания для лигандов различной химической структуры и размера.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований, грант №15-04-02010.

ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ МОГУТ БЫТЬ ВОВЛЕЧЕНЫ В ПАТОЛОГИЮ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**Store-operated calcium channels could be involved in familial Alzheimer's disease pathology*****Рязанцева М.А.1, Скобелева К.В.1, Гончарова А.А.2, Казначеева Е.В.1****1 – Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4**2 – Институт физиологии им. Павлова, 199034, наб. Макарова, д.6**Тел.: +7(812)297-18-29; факс: +7(812)297-35-41; e-mail: mariaandreevna@gmail.com*

Мутации в гене бека пресенилина-1 (PS1) приводят к наследственной болезни Альцгеймера (НБА). Большинство мутаций приводят к потере ферментативной активности этого белка. Нарушение ферментативной активности PS1 приводит к потере эндопротеолиза и накопление неразрезанного белка в нейронах мозга пациентов с НБА. С помощью методов локальной фиксации потенциала, измерения внутриклеточной концентрации кальция и конфокальной микроскопии с живыми клетками мы показали наличие усиленной активности депо-управляемых кальциевых каналов, связанной с гиперактивностью кальциевых сенсоров STIM в клеточных моделях НБА с накоплением неразрезанного белка PS1. Использование специфического ингибитора депо-управляемых кальциевых каналов на животной модели НБА на основе трансгенных дрозофил, полученных в лаборатории, было способно восстановить кратковременную память. Таким образом, депо-управляемые кальциевые каналы могут быть вовлечены в потерю памяти при НБА.

**ПРОЦЕССЫ ИНИЦИАЦИИ, ПОДДЕРЖАНИЯ И ЗАВЕРШЕНИЯ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ:
АНАЛИЗ СВЯЗАННОСТИ ПО ВРЕМЕННЫМ РЯДАМ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ ЭЭГ КРЫС –
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ**

**Processes of initiation, maintenance and termination of spike-wave discharges: coupling analysis
from time series of intracranial EEGs of rats – genetic models**

Сысоев И.В.1, Сысоева М.В.2, Ситникова Е.Ю.3, ван Луйтелаар Э.4, Люттйоханн А.5

1 – Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

2 – Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина, 410054, Саратов, ул. Политехническая, 77

3 – Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, ул. Бутлерова, д. 5А

4 – Радбод университет Неймеген, Нидерланды, 6525 HP Nijmegen, Comeniuslaan 4

5 – Университетская клиника Мюнстера, ФРГ, 48149 Münster, Albert-Schweitzer-Straße 33

Тел.: +7(8452)524689; факс: +7(8452)522705; e-mail: ivssci@gmail.com

Пик-волновые разряды, генерируемые в таламо-кортикальной системе [1], являются электроэнцефалографическим маркером абсансной эпилепсии – распространённой формы заболевания, проявляющейся в первую очередь в детском и подростковом возрасте (по данным ВОЗ больными являются до 5 млн. человек [2]). В данной работе рассматриваются механизмы инициации, поддержания и прекращения абсансных разрядов, вызванные изменением связанности между различными отделами неокортекса и таламуса.

Экспериментальные данные – многочасовые временные ряды внутричерепных ЭЭГ – были получены от 21 крыс линии WAG/Rij [3] в двух экспериментах. Анализ связанности проводился методом нелинейной причинности по Грейнджеру в скользящем окне [4] с помощью специально сконструированной для этого модели [5]. В результате были обнаружены:

- постепенное увеличение силы связи практически во всех парах отведений за 2 с до начала разряда и более;
- падение связанности в первую секунду разряда;
- постепенное возрастание связанности между некоторыми отведениями во время разряда;
- резкое уменьшение связанности до фонового уровня в момент окончания разряда.

На основе полученных результатов сформулирована гипотеза о существовании отдельных процессов инициации и поддержания разряда. Завершение разряда предваряется существенным усилением связанности во всей сети.

1. Meeren H.K., Pijn J.P., Van Luijtelaar E.L., Coenen A.M., Lopes da Silva F.H. // J. Neurosci. 2002. 22(4): 1480-1495.
2. ВОЗ Информационный бюллетень №999, 2012.
3. Sitnikova E, van Luijtelaar G. // Epilepsy Research. 2006. 71:159-180.
4. I.V. sysoev, M.V. Sysoeva. // Physica D 309 (2015) 9–19.
5. М.В.Сысоева, И.В.Сысоев. // Письма в ЖТФ, 2012, том 38, выпуск 3, С 103-110.

ВКЛАД ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОФАМИНА**The Role of Glial Cells in the Neuroprotective Action of Dopamine**

Теплов И.Ю.1, Федотова Е.И.1, Абрамов А.Ю.2, Бережнов А.В.1

1 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

2 – UCL Institute of Neurology, Queen square, London WC1N 3BG

Тел.: +7(4967)73-91-25; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: g_56@rambler.ru

Развитие болезни Паркинсона связано с гибелью дофаминергических нейронов в среднем мозге и с последующим развитием дофамин-дефицитных состояний в других отделах мозга. Мы предположили, что в норме дофамин может защищать нейроны от токсического действия другого нейротрансмиттера – глутамата. При возникновении дофамин-дефицитных состояний даже физиологические дозы глутамата становятся токсичными, что и является одной из причин развития нейродегенерации в различных отделах мозга.

Ранее нами было показано, что дофамин в концентрациях 10-50 мкМ способен защищать культивируемые нейроны мозга от глутаматной токсичности, подавляя активность NMDA-рецепторов. В данной работе мы исследовали влияние дофамина на активность ГАМКергической системы. Было показано, что дофамин вызывает активацию кальциевых сигналов в астроцитах, что, по-видимому, приводит к выбросу глиотрансмиттеров. В результате происходит подавление активности нейрональной сети, причем этот эффект зависит от активности ГАМКА-рецепторов. Такая же активация астроцитов и подавление активности нейрональной сети могут быть вызваны воздействием АТФ. При этом также происходит кратковременная активация хлорных токов в нейронах, чувствительных к блокаторам ГАМКА-рецептора – бикикуллину и пикротоксину.

Помимо этого показан вклад альфа2-адренорецепторов (но не альфа1- и бета1-3-адренорецепторов) в подавление активности нейрональной сети дофамином.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дофамин подавляет возбудимость нейронов гиппокампа через активацию астроцитов, а также через подавление активности глутаматных рецепторов. Обсуждаются возможные механизмы реализации эффекта дофамина на уровне межклеточных взаимодействий и взаимодействий на уровне нейротрансмиттеров.

1. Иванов А.А., Петров В.В. и др. / Биофизика, 1998. Т.1. С.2-3.

НИГЕРИЦИН ИНДУЦИРУЕТ PINK1/PARKIN-НЕЗАВИСИМУЮ МИТОФАГИЮ В КЛЕТКАХ SH-SY5Y ЧЕРЕЗ ЗАКИСЛЕНИЕ ЦИТОЗОЛЯ

Nigericin induces PINK/Parkin-independent mitophagy in SH-SY5Y cells via cytosolic acidification

Федотова Е.И.1, Фролова М.С.1, Зинченко В.П.1, Абрамов А.Ю.2, Бережнов А.В.1

1 – Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

2 – UCL Institute of Neurology, Queen square, London WC1N 3BG

Тел.: +7(4967)73-91-25; факс: +7(4967)33-05-09; e-mail: g_56@rambler.ru

Механизмы «контроля качества митохондрий (МХ)» включают ряд клеточных путей биогенеза и деградаци МХ, обеспечивая нормальное функционирование МХ сети клетки. В настоящее время проявляется большой интерес к выяснению механизмов реализации аутофагии МХ (митофагии – МФ), поскольку нарушения процессов МФ наблюдаются при ряде патологий, в том числе при болезни Паркинсона. При этом механизмы индукции и регуляции МФ остаются не изученными.

Ранее нами было показано, что закисление внутриклеточной среды высокими дозами протонифора FCCP или нигерицином может активировать МФ в клетках нейробластомы SH-SY5Y. Нами был разработан способ количественной оценки индукции МФ с помощью конфокальной микроскопии как степени колокализации МХ и лизосом в клетках, прокрашенных соответственно MitoTracker Green и LysoTracker Red.

В данной работе показано, что для индукции МФ закислением внутриклеточной среды с помощью FCCP, но не нигерицином, необходима активность киназы LRRK2, взаимодействующей с PINK1.

Также, совместно с коллегами из Университетского колледжа Лондона, мы показали, что снижение pH в цитозоле клеток нейробластомы, вызванное нигерицином, активирует МФ по PINK/Parkin-независимому пути. При этом показано увеличение маркера аутофагии LC3 под действием нигерицина в МХ-обогащенной фракции, но не наблюдалось изменений в количестве киназы PINK1 (эксперименты Marc Soutar).

Таким образом, в работе получены данные о возможности активации процессов МФ в клетках по PINK1/Parkin-независимому пути, что может быть в дальнейшем использовано для селективного управления процессами МФ у пациентов с наследственными формами болезни Паркинсона.

ХАОТИЧЕСКАЯ ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММ**Chaotic dynamics of parameters of electroencephalogram****Филатов М.А., Гавриленко Т.В., Григоренко В.В., Шадрин Г.А.**

БУ ВО ХМАО-Югры «Сургутский государственный университет», 628415, РФ, ХМАО, Сургут, пр. Ленина, 1

Тел.: +7(3462)763079; E-mail: kafedra_bin@mail.ru

В клинической медицине при изучении электроэнцефалограмм обычно используются параметры амплитудно-частотных характеристик (АЧХ) регистрируемых биопотенциалов (ЭЭГ). Работа представляет сугубо хаотический характер ЭЭГ, который проявляется в автокорреляционных функциях $A(t)$ и функциях распределения $f(x)$. Предлагаются два новых подхода в оценке параметров электроэнцефалограмм. Первый из них основан на построении матриц парных сравнений регистрируемых выборок биопотенциалов мозга у испытуемых, находящихся в разных физиологических (психических) состояниях: с фотостимуляцией и без нее. Второй метод базируется на расчётах параметров квазиаттракторов, которые на плоскости строятся в координатах $x_1=U(t)$ – функция изменения биопотенциала в точке регистрации и $x_2=dx_1/dt$ – скорость изменения x_1 . Квазиаттракторы в таком двумерном фазовом пространстве количественно различаются по параметрам для больных (эпилепсия) и здоровых испытуемых. Возможна и трёхкомпарментная модель квазиаттрактора в фазовом пространстве состояний, которая также обсуждается. Показывается, что целесообразно использовать и стохастические расчеты, и параметры квазиаттракторов при оценке нормы или патологии. Доказывается неэффективность расчета параметров энтропии Шеннона при моделировании ЭЭГ. В целом, анализ ЭЭГ в норме и при патологии (эпилепсии) с позиции стохастики доказывает, что АЧХ для ЭЭГ носят всё-таки хаотический характер, который имеет место и для автокорреляционных функций $A(t)$. Отсюда следствие – традиционная стохастика в описании ЭЭГ имеет низкую эффективность. На основе анализа объемов квазиаттракторов (КА) V_G можно сделать вывод, что у здорового человека под действием фотостимуляции объемы V_G уменьшаются, что приводит к возникновению отрицательной скорости изменения V_G . У человека, больного эпилепсией, V_G наоборот увеличивается при фотостимуляции и скорость изменения КА будет положительной [3]. На основе метода построения матриц парных сравнений регистрируемых выборок биопотенциалов мозга у испытуемых, находящихся в разных физиологических (психических) состояниях, показано, что у человека больного эпилепсией уже изначально имеется большое количество k «совпадений» пар выборок ЭЭГ в период релаксации ($k=103$), а в период фотостимуляции оно незначительно возрастает (до $k=104$). Такая же динамика наблюдается и у здорового человека, но количество совпадений пар в период релаксации $k=33$, а в период фотостимуляции $k=37$. Это количественно (для эпилептика) свидетельствует о высоком уровне генерализации ЭЭГ, вследствие чего мы наблюдаем большое количество совпадений пар k и увеличение V_G для КА. В таких цифрах можно оценивать степень генерализации ЭЭГ, что мы и предлагаем делать в практической неврологии. Расчёт матриц парных сравнений выборок и расчёт параметров КА обеспечивает количественно оценку функционального состояния человека с новых позиций теории хаоса-самоорганизации [1-3].

1. Гавриленко Т. В., Еськов В. М., Хадарцев А. А., Химикова О. И., Соколова А. А. Н // Успехи геронтологии. – 2014. – Т. 27, № 1. С. 30–36.
2. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Зимин М.И. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия. 2014. № 5. С. 41-46.
3. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Вохмина Ю.В. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия. 2015. № 2. С. 1.

СТОХАСТИКА И ХАОС В ЭЛЕКТРОМИОГРАФИИ

Stochastics and chaos at electromyography

Филатова О.Е., Гавриленко Т.В., Горбунов Д.В., Эльман К.А., Григоренко В.В.

Сургутский государственный университет, 628415, РФ, ХМАО, Сургут

Тел.: +7(3462)763150; E-mail: kafedra_bin@mail.ru

При изучении и моделировании сложных биологических объектов возникает возможность сравнения традиционных физических методов в биологических исследованиях и новых методов теории хаоса-самоорганизации [1,2]. В представленной работе демонстрируется новый подход на основе метода анализа двумерных фазовых пространств при изучении особенностей реакции нервно-мышечной системы в ответ на дозированные статические нагрузки. Вместо традиционного понимания стационарных режимов биосистем в виде $dx/dt = 0$, где $x = x(t) = (x_1, x_2, \dots, x_m)^T$ является вектором состояния системы (ВСС), $x_1(t)$ – величина биосигналов, $x_2(t) = dx_1/dt$, $x_3(t) = dx_2/dt$, используются параметры квазиаттракторов (КА), внутри которых наблюдается движение ВСС в фазовом пространстве состояний. Эти движения ВСС имеют хаотический характер, т.е. постоянно $dx/dt \neq 0$, но при этом движение ВСС ограничено объемом КА [1,2].

Для исследования была привлечена группа испытуемых (15 девушек) в возрасте от 20 до 25 лет. У испытуемых многократно регистрировались электромиограммы – ЭМГ $x_1(t)$ с периодом дискретизации $\mu = 0.25$ мс. Записи миограмм мышцы (сгибателя мизинца) обрабатывались программным комплексом для формирования вектора $x = (x_1, x_2)^T$. На основе полученного ВСС строились КА динамики поведения мышцы и определялись объемы полученных КА V_G по формуле $V_G^{\max} \geq \Delta x_1 * \Delta x_2 \geq V_G^{\min}$ [1,2], где Δx_1 – вариационный размах величины биопотенциала, а Δx_2 – его скорости изменения. Установлено не только для электромиограмм, но и для треморограмм, что динамика изменения энтропии E Шеннона для всей группы испытуемых имеет непараметрическое распределение. Более того, различие среднего значения $\langle E \rangle$ для ЭМГ при слабой нагрузке ($\langle E \rangle = 2,547$) от таковых для сильного напряжения ($\langle E \rangle = 2,607$) весьма незначительно. Это говорит о слабой чувствительности метода расчета энтропии E для ЭМГ. Более того, динамика изменения значения энтропии Шеннона неустойчива для всей группы и с позиции статистики различия в выборках ЭМГ отсутствуют ($p = 0,68$, при критическом значении $p < 0,05$) [1,2].

Исследование подтвердило эффективность применения методов многомерных фазовых пространств в качестве меры динамики изменения миограмм. Площадь КА при слабом напряжении всегда меньше площади КА при сильной нагрузке мышцы сгибателя мизинца. При этом мы наблюдаем существенное (почти в 3 раза) увеличение V_G для КА, а рост значений энтропии Шеннона весьма незначительный (на 0,05 у.е). Одновременно все функции распределения для $x_1(t)$ для ЭМГ тоже демонстрируют различия, что характеризует ЭМГ как нестационарный процесс [2], но имеющий ограничения в виде КА.

1. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Зимин М.И. // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия.– 2014.– № 5.– С. 41–46.

2. Еськов В.М., Еськов В.В., Гавриленко Т.В., Вахмина Ю.В. // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия.– 2015.– № 2.– С. 62–73.

УЧАСТИЕ Ca^{2+} В СМЕРТИ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ АКСОТОМИИ МЕХАНОРЕЦЕПТОРНОГО НЕЙРОНА РАКА**Participation of Ca^{2+} in death of glial cells in crayfish stretch receptor following axotomy****Хайтин А.М., Рудковский М.В., Узденский А.Б.**

Академия биологии и биотехнологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

Тел.: +7(928)779-38-54; e-mail: andrej.wojt@gmail.com

Аксотомия происходит при нейротравмах и ранах, в частности, когда нарушается целостность периферических нервов. Нарушение кальциевого гомеостаза – один из характерных результатов аксотомии. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ – сигнал, регулирующий выживание и смерть клеток. Реакция сателлитных глиальных клеток (ГК) на повреждение аксона изучена недостаточно. Мы изучали участие Ca^{2+} в вызванной аксотомией смерти механорецепторных нейронов и глии рака. 3-кратное повышение концентрации Ca^{2+} в среде ($3[Ca^{2+}]_o$) повышало уровень апоптоза ГК, окружающих аксотомированные, но не интактные нейроны, а понижение ($1/3[Ca^{2+}]_o$) – не влияло на апоптоз глии, но повышало некроз ГК, окружающих интактные и аксотомированные нейроны. Напротив, повышение $[Ca^{2+}]_o$ приводило к понижению некроза ГК, как вокруг интактных, так и аксотомированных нейронов. Некроз ГК вокруг аксона был выше, чем вокруг сомы нейрона. Ca^{2+} ионофор иономицин повышал апоптоз глии вокруг интактных и аксотомированных нейронов, но не влиял на некроз ГК вокруг интактных нейронов. Но он повышал некроз ГК, окружающих аксотомированные нейроны. Ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикула тапсигаргин, также как и иономицин, повышающий $[Ca^{2+}]_i$, повышал некроз и апоптоз глии в аксотомированных препаратах. В отличие от глии, в нейронах некроз и апоптоз не наблюдались. Следовательно, проникновение Ca^{2+} в глиальные клетки стимулирует индуцированный аксотомией апоптоз. Для выяснения вопроса, влияет ли аксотомия на жизнеспособность ГК только в месте перерезки аксона или сигналы, индуцирующие некроз или апоптоз ГК распространяются на всю глиальную оболочку нейрона, мы по отдельности изучали смерть глии, окружающей начальный сегмент аксона и тело нейрона. Так как изменение уровня некроза и апоптоза происходило в обоих местах, то можно предположить, что сигнал о повреждении (ретроградная кальциевая волна), распространяется по аксону до сомы, где сигнал передается от нейрона на сателлитные ГК. С другой стороны, в месте разреза нерва ионы Ca^{2+} могут попадать в поврежденные ГК и распространяться по глиальному синцитию в виде кальциевой волны. $[Ca^{2+}]_o$, таким образом, влияет на механизмы, определяющие характер клеточной смерти ГК и смещает баланс некроз/апоптоз в сторону апоптоза. Так как в аксотомированных препаратах некроз глии в присутствии иономицина и тапсигаргина был достоверно сильнее, чем в интактных, то можно предположить, что результаты входа Ca^{2+} в цитозоль через аксональный просвет, плазматическую мембрану и из эндоплазматического ретикула складываются. При этом изменение $[Ca^{2+}]_o$ влияет на характер клеточной смерти иначе.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОДИНАМИКИ СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ СОСТОЯНИЙ В СЕТЯХ С ЧЕТНЫМ ЦИКЛИЧЕСКИМ ТОРМОЖЕНИЕМ

Investigation of synchronized state neurodynamics in even cyclic inhibitory networks

Харыбина З.С.1

1 – Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, 344000, Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1 Тел.: +7(918)557-54-76; e-mail: har_zs@rambler.ru

Исследование нейродинамических основ навигационного поведения является актуальной задачей современной нейронауки. Важную роль в этих исследованиях играет модельный подход. Данная работа посвящена исследованию механизмов синхронизированной активности нейронов в ранее опубликованной модели навигационного поведения, основанной на сетях с четным циклическим торможением (ЕСI-сетях) [1,2].

Согласно разрабатываемой идеологии частотно-фазового кодирования, навигационное поведение определяется взаимодействием двух конкурирующих популяций клеток, чувствительных к поворотам по и против часовой стрелки (CW- и CCW-кластеров). Ключевым для определения результата такого взаимодействия является синхронная активность нейронов, входящих в состав данных кластеров. Поэтому центральным вопросом для определения в дальнейшем целенаправленного поведения является исследование механизмов синхронизации в ЕСI-сетях.

Различие в амплитуде сигналов, поступающих на входы сети, приводит к формированию фазового разнообразия в ответах информационных единиц. Тем не менее, увеличение контекстного входа (что соответствует увеличению мембранного потенциала клеток в ходе движения), приводит к их синхронизации и формированию ступенек локальной фазовой когерентности, соответствующих аттракторным состояниям сети.

Проведенные вычислительные эксперименты показывают, что синхронизированной активности можно добиться и при малых значениях контекстного входа, вне этих ступенек. Это возможно при увеличении энергии входных воздействий, что достигается увеличением амплитуды сигналов, либо увеличением их длительности. Также подобного эффекта можно добиться при последовательной подаче на входы сети двух или более событийных паттернов, разделенных небольшим временным интервалом.

Особенностью ЕСI-сетей является наличие чувствительной временной зоны перед генерацией эндогенных пачечных осцилляций, в которой малоэнергетические входные сигналы способны вызвать существенный сдвиг ритма. Следствием этого является синхронизация активности информационных единиц сети при подаче сигналов ближе ко времени генерации осцилляций.

Важно отметить, что синхронизация возможна только при единовременном поступлении сенсорных сигналов на входы всех информационных единиц, входящих в состав CW и CCW-кластеров. Если время подачи сигналов варьируется, то при перечисленных выше условиях синхронизации внутри кластеров не происходит, что делает невозможным определение сетевого выхода, а значит, и дальнейшего направления движения, не позволяя решать поведенческие задачи.

1. Цукерман В.Д., Еременко З.С., Каримова О.В., Кулаков С.В. / Математическая биология и биоинформатика, 2012. Т.7. №1. С.206-243.
2. Цукерман В.Д., Харыбина З.С., Кулаков С.В. / Математическая биология и биоинформатика, 2014. Т.9. №1. С.216-256.

НЕЙРОДИНАМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЛЯЦИОННОЙ ЭПИЗОДИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ**Neurodynamical basis of relational episodic memory*****Цукерман В.Д., Кулаков С.В.***

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1 e-mail: vdts@krinc.ru

Две широко признанные точки зрения связывают энторинально-гиппокампальную систему мозга с решением задач пространственной навигации и эпизодической памяти – на первый взгляд двух различных фундаментальных когнитивных функций. Однако, современные данные свидетельствуют о возможности реализации этих функций одними и теми же нейронными механизмами [1]. Эпизодическая память – многостадийный динамический процесс. Кодирование событийных последовательностей сигналов, сжатие, паттерн-завершение (заполнение рабочей памяти), консолидация (запись в долговременную память), хранение и вызов из памяти эпизодов реализуются в сложном взаимодействии нейросетевых, клеточных и субклеточных механизмов (в докладе рассматривается нейросетевой уровень). Основной характеристикой эпизодической памяти является способность сохранять многочисленные ортогональные, т.е. несвязанные представления, проходя указанные выше нейросетевые стадии обработки, в результате которых они получают вид целостных поведенческих актов. Ясные параллели между интеграцией пути и эпизодической памятью с одной стороны, и аллоцентрической навигацией и семантической памятью, с другой, определяемые их пространственно-временным контекстом, свидетельствуют о возможности их поддержания в двух пространствах: физическом и ментальном. Это предположение поддерживается выбором гиппокампальных клеточных ансамблей из репертуара существующих временных последовательностей активности, обнаруженных в экспериментальных исследованиях грызунов [2]. Вместе с тем, один из наиболее сложных и наименее определенных процессов связан с организацией имитационного обучения (обучения подражанием). Подражание является одной из базовых форм обучения, нейрофизиологической основой которого является система «зеркальных» нейронов, обнаруженная в fMRI исследованиях и на клеточном уровне у приматов, в том числе у человека [3]. Существующие данные свидетельствуют о том, что большая часть париетальных и фронтальных моторных областей коры кодируют целенаправленные моторные действия [3], однако, имеются основания говорить о значительно более широком участии зеркальных нейронов в деятельности мозга. В частности, зеркальный механизм, вероятно, является посредником множества когнитивных функций, в т.ч. понимания намерений, распознавания и продуцирования фонем, эмоций и др. [4], и по нашему мнению, принимает участие в формировании эпизодической памяти. Последний вывод основан на собственных вычислительных экспериментах с использованием гипотезы о свободно-масштабируемой эпизодической памяти, как адаптивного ответа мозга на окружающий нас мир со структурой в многочисленных временных шкалах.

1. Buzsaki G., Moser E.I. / Nature Neurosci., 2013. V. 16, P. 130-138.
2. Dragoi G, Tonegawa S. / Phil. Trans. R. Soc. B, 2014.369: 20120522.
3. Rizzolatti G., Fabbri-Destro M. et al./ Nature Clin. Practice Neurology, 2009. V.5. P.24-34.
4. Rizzolatti G., Sinigaglia C. 2010 Nature Review Neurosci., 2010. V. 11. P. 264-274.

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ РЕЛЕЙНЫХ ЯДЕР ТАЛАМУСА МОЗГА КРЫСЫ

Ultrastructural studies of structural and functional features of gap junction in relay thalamic nuclei of rat brain

Чурюмова Г.А., Кириченко Е.Ю., Логвинов А.К.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ 344090, Ростов-на-Дону, ул. Стачки, 194/1

Тел.: +79054557613; e-mail: churumova08@gmail.com

Щелевые контакты (ЩК) представляют собой один из видов межклеточного соединения, играющий важную роль в процессах развития, созревания нервной системы и в механизмах нормального функционирования мозга. Показано, что в коре мозга млекопитающих глиальные клетки, объединенные глиа-глиальными ЩК, посредством регуляции внеклеточного ионного гомеостаза, оказывают влияние на синаптическую активность нейронов [1]. В тоже время нейро-нейрональные ЩК, обнаруженные между отростками ГАМК-эргических парвалбуминовых нейронов, с помощью прямой электротонической передачи обеспечивают синхронизацию осциляторной активности нейрональных группировок гиппокампа и коры мозга крысы [2,3]. При этом особенности релейных ядер таламуса, являющихся вторым уровнем представительства вибрисс в мозге крысы, остаются малоизученными. Целью данного исследования являлось ультраструктурное исследование структурно-функциональных особенностей ЩК в области релейных ядер таламуса. Для проведения ультраструктурного исследования животным под глубоким эфирным наркозом проводили транскардиальную перфузию изотоническим и фиксирующим растворами, изготавливались вибротомные срезы, фрагменты исследуемых ядер таламуса обрабатывались общепринятыми методами для электронной микроскопии и просматривались на электронном микроскопе (EM-208, Philips, Нидерланды). Ультраструктурное исследование релейных ядер таламуса выявило многочисленные ЩК, имеющие характерную семислойную структуру. Показано, что глиа-глиальные ЩК в большинстве случаев локализуются с противоположных полюсов глиальных клеток, окружающих таламо-кортикальные аксоны, а также в непосредственной близости к синаптическим терминалям химических синапсов. Обнаруженные нейро-нейрональные ЩК в большинстве случаев располагаются между дендритами нейронов. Также был выявлен случай формирования ЩК на аксоне, формирующем аксо-дендритический химический синапс. Характерно, что нейро-нейрональные ЩК локализуются в непосредственной близости от химических синапсов. Полученные данные об особенностях локализации глиа-глиальных ЩК в исследуемых ядрах таламуса свидетельствуют о том, что глиальные клетки могут принимать активное участие в регуляции нейрональной активности, посредством контроля над внеклеточным ионным и нейротрансмиссивным гомеостазом, и тем самым, играют особую роль в структурно-функциональной организации этих ядер. В свою очередь особенности локализации нейро-нейрональных ЩК позволяют предположить взаимодополняющие синхронизирующие действия между данными контактами и химическими синапсами, что свидетельствует об их значительном вкладе в генерацию и синхронизацию локального эндогенного ритмогенеза нейрональных группировок релейных ядер таламуса.

1. Genoud C., Houades V., et al. / Neuroscience, 2015, T. 291, C. 241–249.
2. Fukuda T., Kosaka T. / Neuroscience, 2003, T. 120, C. 5–20.
3. Wang H., Hu Y., et al. / Progress in Neurobiology, 2010, T.79, C.123-135.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ РАСТВОРА БЕЛКА, ВВЕДЕННОГО В ТКАНЬ СПИННОГО МОЗГА ПОСЛЕ ДОЗИРОВАННОЙ КОНТУЗИИ**Spatial distribution of the protein solution in the injured spinal cord following contusion and microinjection****Шайхутдинов Н.М.1, Арнт Н.И.1, Мельникова А.А.1, Балтина Т.В.1, Павельев М.Н.2**

1 – Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18;

2 – Университет Хельсинки, 00790, Виикинкаари 4, Хельсинки, Финляндия

Тел.: +7 (937) 281-82-95; e-mail: nurislam.schahutdinov@yandex.ru

Доставка биологически активных веществ, возможных лекарственных средств в нервную ткань после травм различной природы является актуальной задачей на сегодняшний день вследствие 1) необходимости стимуляции посттравматической регенерации и 2) непроницаемости гематоспинального барьера для биологически активных белковых молекул. Цель данной работы – найти наименее травматичный способ введения веществ, оптимизировать процедуру введения на лабораторных крысах и изучить распределение введенных маркеров в травмированную ткань спинного мозга, осуществленной по методике (Allen, 1911). В качестве объекта исследования использовались крысы возрастом 3-4 месяца. Проводилась ламинэктомия и контузия на T9 сегменте спинного мозга и введение двух различных веществ с помощью шприца Гамильтона объемом 10 микролитров удерживаемый в стереотаксисе, приводимом в движение микроманипулятором Narishige, Japan. Кончик стеклянного капилляра диаметром 110 мкм вводился под дуру на глубину 1,5 мм и 2 мм каудальнее от эпицентра травмы для доставки вещества к эпицентру и пенумбре травмированной ткани. Скорость введения была фиксированной и составила 2.2 нанолитра в секунду. Такая низкая скорость была выбрана для предотвращения возникновения дополнительной травмы от инъекции. Ткань фиксировалась через 10 минут после микроинъекции растворов. В настоящей работе использовались растворы анилинового зеленого и иммуноглобулина козы, конъюгированного с флуорофором Alexa 647. В работе использовались три различных способа доставки вещества: с помощью инсулинового шприца, системы электронный контроллер PV830 Pneumatic Picosump (World Precision Instruments, Флорида) и описанного ранее шприца Гамильтона. Наилучшую воспроизводимость результатов показал Hamilton syringe – на гистологических срезах отчетливо видна повторяемость результатов. Полученная гистограмма трехмерного распределения Alexa 647-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin показала, что наилучшее распределение вещества наблюдалось на глубинах чуть выше положения кончика капилляра. На этой глубине распространение флуоресцентной метки вдоль спинного мозга составило 743 мкм краниально и 840 мкм каудально от места введения вещества. Окрашивание ткани флуоресцентным антителом уменьшалось вдоль оси Z в обоих направлениях от глубины введения кончика. Также было выявлено, что вводимое антитело лучше окрашивает или связывается с серым веществом, чем с белым веществом спинного мозга. Таким образом, был выявлен наиболее пригодный микроинъектор для доставки биологически активных веществ в нервную ткань спинного мозга, а также изучено пространственное распространение флуоресцентно меченого иммуноглобулина в травмированной ткани спинного мозга.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ BDNF И GDNF В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Ultrastructural changes in cells of primary cultures of hippocampus under exposure of neurotrophic factors BDNF and GDNF in hypoxia

Широкова О.М.1,2, Мищенко Т.А.1,2, Ведунова М.В.1,2, Яковлева Е.И.2, Мухина И.В.1,2

1 – Нижегородский национальный исследовательский университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, 603950.

2 – ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, 603005
Тел.: +7(920)0545152; 412-37-83; e-mail: shirokovaom@gmail.com

Изучение механизмов поддержания жизнедеятельности клеток головного мозга в условиях гипоксии остается одной из актуальных проблем нейробиологии и медицины. Согласно современным представлениям, нейротрофические факторы играют ключевую роль в функционировании нейронных сетей в условиях стресса. Однако, вопрос о механизмах защитного действия нейротрофинов остается открытым. Целью данного исследования явилось изучение нейротропных свойств BDNF и GDNF на ультраструктурном уровне при моделировании гипоксии *in vitro*.

Исследования проведены на первичных культурах клеток гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии СВА, на 14-й день развития *in vitro*. Моделирование кратковременной нормобарической гипоксии осуществляли по протоколу, описанному ранее [1]. Ультраструктуру клеток культур анализировали через 24 часа после реоксигенации.

Гипоксия/реоксигенация вызывала достоверное снижение количества зрелых синаптических контактов, особенно тормозных синапсов, полное отсутствие смешанных контактов, характерных для данной стадии развития культуры, снижение количества дендритных шипиков. Митохондрии имели нормальную морфологию только в аксонах и некрупных дендритах, тогда как в крупных дендритах и телах нейронов отмечались их массовые деструктивные повреждения, такие как набухание, нарушение пространственной организации крист, просветление матрикса, образование миелиноподобных структур. В глиальных клетках отмечался значительный внутриклеточный отек, нарушались межклеточные контакты. Добавление нейротрофического фактора BDNF во время гипоксии частично сохраняло структуру зрелых и десмосомных контактов, количество дендритных шипиков. Встречалось большое количество симметричных синапсов, а также щелевидных контактов между глиальными клетками. Морфология митохондрий в отростках нейронов была сопоставима с морфологией митохондрий контрольной группы с нормальным содержанием кислорода. В тоже время в клеточных телах митохондрии имели просветленный матрикс, изменялась конфигурация крист, а также встречались митохондрии с частично разрушенными кристами и явлением митоптоза. Добавление нейротрофического фактора GDNF практически полностью сохраняло структуру синапсов, глиальных контактов, дендритных шипиков, но не предотвращало нарушение ультраструктуры митохондриального аппарата. Внутри большей части митохондрий крупных отростков и тел нейронов наблюдались митохондрии с нарушенной структурой.

Таким образом, нейротрофические факторы BDNF и GDNF обладают антигипоксическими свойствами разнонаправленного действия при экспериментальном моделировании гипоксии *in vitro*, предупреждая нарушение структуры внутриклеточных органелл и межклеточных контактов.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ GDNF В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ К ОСТРОЙ ГИПОКСИИ В МОДЕЛИ *IN VITRO***Studying the role of GDNF in the formation of a stable neural networks in the modeling of acute hypoxia *in vitro***

Шишкина Т.В. 1,2, Ведунова М.В. 1,2, Мищенко Т.А.1,2, Митрошина Е.В.1,2, Мухина И.В. 1,2

1 – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23

2 – Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005,

Тел.: 89063691935; e-mail: schischkina.tatiana2012@yandex.ru

Гипоксия является одним из основных повреждающих факторов при ишемии, травмах головного мозга и других патологиях. Гипоксия приводит к разобщению окислительного фосфорилирования, нарушению энергетического обмена клеток, запуску патохимических каскадных реакций. Среди химических веществ, способных поддерживать жизнеспособность и функциональную активность клеток, контролировать уровень метаболизма клеток в стрессогенных условиях выделяют нейротрофические факторы головного мозга. Особое внимание уделяется изучению нейротрофических свойств глиального нейротрофического фактора. Исследования проводились на первичных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии CBA. Культивирование осуществлялось на покровных стеклах и мультиэлектродных матрицах MED64 системы (Alfa MED Science, Япония) и MEA60 системы (MultichannelSystems, Германия). На 14 день развития проводилось моделирование нормобарической гипоксии путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Предварительно, за 20 минут до начала гипоксии в экспериментальную группу добавлялся 1нг/мл GDNF, в контрольную группу вошли культуры, которым моделирование гипоксии проводилось без аппликации GDNF. Показано, что гипоксия вызывает резкое увеличение числа мертвых клеток уже на первые сутки постгипоксического периода. В течение 7 дней происходит гибель основной части клеток культуры. Установлено, что количество мертвых клеток после моделирования гипоксии достоверно ($p < 0,05$) возрастает в 4,5 раза по сравнению с интактной группой. Количество мертвых клеток в группе с превентивным добавлением GDNF оказалось достоверно ($p < 0,05$) меньше (в 2,5 раза). При исследовании влияния GDNF (1нг/мл) на спонтанную биоэлектрическую активность, было установлено, что значения параметров (количество малых сетевых пачек и количество спайков в пачках) спонтанной биоэлектрической активности после добавления GDNF достоверно не различались, ни по сравнению с исходным уровнем, до аппликации GDNF, ни в течение всего периода исследования. При анализе изменений спонтанной биоэлектрической активности после моделирования гипоксии, было выявлено, что кратковременная гипоксия вызывает необратимые изменения сетевой активности нейронов. К 7 дню постгипоксического периода спонтанная биоэлектрическая активность в контрольной группе снижалась в 3,5 раза. При этом значение нейросетевой активности группы, в которой применялся GDNF, восстанавливалось до первоначального значения. Таким образом, исследования показали, что превентивное применение GDNF нивелирует негативные последствия кислородной недостаточности, повышая жизнеспособность клеток и сохраняя сетевую пачечную активность культур клеток гиппокампа на определенном функциональном уровне.

Биофизическое образование

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРОФОТО- И РЕДОКС-МЕТРИИ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДИВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВОЛОС МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Possibility of using of the mammal hair species' identification with spectrophotometry and redoxmetry in the educational process

Комарова С.А.

Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии им. К.И.Скрябина, 109273, Москва, ул. Акад.Скрябина, 23.

Спектрофотометрические методы чрезвычайно чувствительны и позволяют изучать незначительные количества вещества даже в довольно сложных многокомпонентных системах. Методика основана на способности каждого вещества поглощать свет с разной интенсивностью при разных длинах волн. [1] Поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект, и оно тем больше, чем выше концентрация вещества в растворе, его толщина, способность вещества к поглощению. В результате чего есть возможность получить спектр поглощения, свойственный какому-либо определённому биологическому образцу. В спектре поглощения обычно выявляются доминирующие показания, характерные для химических групп лишь одного типа — хромофоров. Для белков характерны два максимума поглощения: один — на границе вакуумной УФ области (200-210нм) и второй — в средней УФ области (длинноволновый максимум поглощения). Поглощение белков в области 250-300 нм обусловлено главным образом ароматическими аминокислотами (триптофан, тирозин, фенилаланин) и сопровождается электронными переходами в плоскости ароматического кольца. Свет с интервалом длин волн равном 230-300 нм поглощают гистидин и серосодержащие аминокислоты — цистин, цистеин и метионин.

В лабораторном Практикуме по физике и биофизике (факультеты товароведения и экспертизы сырья, ветеринарно-санитарной экспертизы, ветеринарно-биологический) в 2014/15 уч.гг. была опробована возможность определения полос поглощения, оптической плотности и спектров поглощения щелочных гидролизатов волос млекопитающих разных видов животных. Отработана методика проведения лабораторных работ по этой тематике и показана перспективность её использования в 4^х-часовых лабораторно-практических занятиях в группах. Редокс – потенциал характеризует активность восстановителей и окислителей любого раствора или способность этого раствора отдавать или принимать электроны.[2] Волосяной покров всех животных имеет неоднородный состав и зависит от степени ороговения клеток волоса. Основная составная часть волоса — кератин —характеризуются высоким содержанием серы. Щелочные растворы кератинов изменяют свой редокс-потенциала под действием света, что обусловлено соотношением сульфгидрильных (SH) и дисульфидных (SS) групп. Редокс-потенциал белка зависит от его химического состава, соответственно различия в результатах может говорить о том, что кератины разных видов животных отличаются по своему аминокислотному составу. По изменению редокс-потенциала щелочных гидролизатов шерсти животных можно определить видовую принадлежность исследуемого волоса.[3] На проведение таких лабораторных работ требуется также не более 4 аудиторных часов. Однако нужно предварительно приготовить необходимое количество растворов гидролизатов.

Опыт проведения лабораторных работ в группах студентов разного уровня подготовки позволяет провести внедрение методов спектрофотометрии, денситометрии и редоксметрии в учебный процесс на всех факультетах академии очной, заочной и вечерней форм обучения.

1. Коренман И.М. /Фотометрический анализ, 2011. С. 200-207

2. Физер Л., Физер М./Органическая химия в 2 томах. Т.2. 1966 г. С. 680

3. Булыга Л. П./Исследование животных близких видов в практике судебной экспертизы. 1980 С. 123.

ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ИЗОМЕРИИ И МЕТОДА ПОЛЯРИМЕТРИИ В ФИЗИЧЕСКОМ ПРАКТИКУМЕ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА**Studying the phenomenon of optical isomers and method polarimetry in physical Workshop for students of pharmaceutical faculty**

Лысенко Е.П., Резников И.И.

Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И.Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1 e-mail: elysenko1@mail.ru

Известно, что стереоспецифичность лекарственных препаратов – один из факторов их эффективности и безопасности. На кафедре физики и математики РНИМУ им.Н.И.Пирогова разработана методика проведения лабораторно-практического занятия для студентов фармацевтического факультета, на котором они знакомятся с физическими основами таких явлений, как оптическая активность, оптическая изомерия (хиральность) биомолекул, различными классификациями энантиомеров: D/L и R/S системами; классификацией изомеров в соответствии с направлением вращения ими светового вектора плоскополяризованной световой волны (+/-). Внимание студентов обращается на то, что большинство лекарственных препаратов состоят из хиральных молекул, поэтому они должны быть изготовлены с высокой энантиомерической чистотой в связи с возможными токсическими эффектами одного из энантиомеров или отсутствием у него терапевтических свойств. На занятии приводится много примеров диастереоспецифичных лекарств, рассматриваются биофизические механизмы взаимодействия хиральных молекул лекарств с рецепторами человеческого организма. В фармацевтике с помощью метода поляриметрии могут измеряться концентрация и чистота веществ, которые обладают оптической активностью. К ним относятся различные анальгетики, антибиотики, витамины, стероиды, транквилизаторы, диуретики. Метод поляриметрии используется для измерения концентрации глюкозы, фруктозы, аминокислот и аминокислот, крахмала, сахарозы и природных масел. Поляриметрический контроль чистоты, а следовательно качества препаратов, прописан как эталонный во многих мировых стандартах (GLP/GMP/ISO/ГОСТ и др.) и является обязательным для международных фармакопей. В лабораторной работе «Изучение оптической активности растворов глюкозы и фруктозы методом поляриметрии» студенты знакомятся с методом поляриметрии, устройством и принципом работы поляриметра СМ-3 и исследуют оптическую активность правовращающего изомера глюкозы и левовращающего изомера фруктозы. Несмотря на то, что молекулы этих двух природных сахаров имеют D-конфигурацию, глюкоза является правовращающим (+), а фруктоза – левовращающим (-) изомером. В работе предлагается определить направление вращения светового вектора растворами этих двух моносахаров, проверить выполнение закона Био, определить удельное вращение глюкозы и фруктозы, а также найти концентрацию неизвестных растворов. После усвоения теоретического материала и выполнения лабораторной работы студентам даётся представление о современных физико-химических методах, используемых для обеспечения энантиомерической чистоты фармпрепаратов. К ним относятся: метод ЯМР с использованием хирального растворителя или с применением комплексов парамагнитных ионов Eu^{3+} , Pr^{3+} , Yb^{3+} с хиральными лигандами; метод хиральной хроматографии (с использованием оптически селективной модификации сорбента); метод хирального капиллярного электрофореза с получением диастереомерных производных энантиомеров с хиральным селектором и метод спектрополяриметрии с регистрацией кривых дисперсии оптического вращения вблизи полосы собственного (резонансного) поглощения вещества.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО КОМПЬЮТЕРНОГО КОМПЛЕКСА С СИСТЕМОЙ LABVIEW В ФИЗИЧЕСКОМ ПРАКТИКУМЕ

Use of universal computer complex with LabVIEW system in physical practical training session

Резников И.И., Лысенко Е.П.

Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет
им. Н.И.Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
e-mail: riig@migmail.ru

Один из возможных вариантов совершенствования физического практикума для студентов медвузов может быть связан с использованием универсального многофункционального компьютерного комплекса с системой LabVIEW, разработанного на основе технологии компании *National Instruments*. Системы LabVIEW – компьютерные платы с соответствующим программным обеспечением, содержащие виртуальные усилители, генераторы и другие приборы, легко коммутируемые друг с другом в зависимости от решаемой задачи, а также подключаемые к ним внешние устройства (электроды, датчики и т. д.). Один такой компьютерный приборный комплекс может быть приспособлен для самых разных измерений путем подбора датчиков или устройств с возможностью дозируемых воздействий на исследуемые объекты. Использование технологии виртуальных приборов позволяет изменить подходы при диагностических исследованиях, связанных с проведением измерений медико-биологических сигналов и их обработкой, а также при моделировании медико-биологических процессов.

На кафедре физики и математики РНИМУ им. Н.И.Пирогова подготовлены несколько лабораторных работ для студентов с использованием многофункционального компьютерного комплекса и среды графического программирования LabVIEW. Эти работы могут выполняться в физическом практикуме медицинских вузов при изучении дисциплин «Физика и математика» и «Основы физических методов в диагностике и терапии».

В работе «Физические основы получения и обработки электрокардиограмм с использованием ПК и среды графического программирования LabVIEW» студенты исследуют электрокардиограмму, отображённую на мониторе ПК виртуальным электрокардиографом с использованием сенсора ECG-BTA. ЭКГ может регистрироваться как с человека, так и с имитатора ЭКГ. Применяется система сбора данных Verner Sensor DAQ. В ходе работы измеряются длительность временных интервалов, частота сердечных сокращений, величины зубцов в трёх отведениях ЭКГ, и определяется угол наклона электрической оси сердца. Результаты сохраняются на диске ПК и могут использоваться для их дальнейшей обработки, например для оценки вариабельности частоты или периода сердечных сокращений, представления вариабельности R-R интервалов в виде графиков Пуркинье.

В лабораторной работе «Изучение метода ультразвуковой эхолокации с использованием ПК и среды графического программирования LabVIEW» используется УЗ датчик Motion Detector 2 MD-BTD и система сбора данных Verner Sensor DAQ. Студенты изучают принцип УЗ эхолокации, определяют расстояние до исследуемого объекта, размеры объекта и скорость его движения, а также предел разрешения УЗ-датчика.

В работе «Снятие спектральной характеристики уха на пороге слышимости» студенты изучают физиологические характеристики звукового восприятия, знакомятся с основами аудиометрии. С помощью среды графического программирования LabVIEW на мониторе ПК отображается панель виртуального аудиометра, при помощи которого регистрируются аудиogramмы левого и правого уха. В работе используются наушники Philips SHP1900, измеритель уровня интенсивности звука Sound Level Meter BTA и система сбора данных Sensor DAQ.

БИОФИЗИКА КАК УЧЕБНАЯ ДИСЦИПЛИНА В АГРАРНОМ ВУЗЕ**Biophysics as an academic discipline in the agricultural university**

Плутахин Г. А., Коцаев А. Г., Федулов Ю. П.

*Кубанский государственный аграрный университет, 350044, Краснодар, ул. Калинина, 13
Тел. +7(861)221-56-37, e-mail: pgasub@yandex.ru*

Биофизика как учебный курс является обязательной для студентов биологических специальностей классических университетов, и определенное место занимает в медицинских и аграрных вузах. Специальности, получаемые студентами аграрных вузов в современных условиях, связаны со сложными биологическими системами и процессами трансформации в них энергии. В биофизических исследованиях используют флуоресценцию хлорофилла в растениях и микроводорослях для относительной оценки интенсивности фотосинтетических процессов, что позволяет оценивать продуктивную составляющую фотосинтеза. Выполнено много прикладных научных исследований по предпосевной обработке семян лазерным излучением. Важнейшей задачей является развитие экспресс методов для оценки состояния экосистем, что позволит решить современные экологические проблемы. Современные направления исследования биофизики – математическое моделирование, нанобиология, фотобиологические процессы, физика белковых и мембранных структур. Научные исследования проводятся преимущественно в тех вузах, которые готовят специалистов этого направления. В настоящее время имеются учебники по биофизике, написанные для студентов классических университетов по различным специальностям, для студентов же аграрных вузов только для ветеринаров [1]. Так, в Кубанском ГАУ биофизика преподается на ряде факультетов биологического профиля. Разработанные учебные программы учитывают специфику специальности и включают лекции и лабораторный практикум, где широко используются современные информационные технологии. Созданы мультимедийные лекционные курсы для студентов всех специальностей и направлений подготовки. Готовится курс «Биофизические методы исследования в биотехнологии» для аспирантов, обучающихся по направлению «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)». На протяжении двух десятилетий создается и совершенствуется учебно-методическая база. Написан ряд учебных пособий, последнее из которых охватывает широкий круг вопросов специальностей аграрных вузов [2]. Лабораторный практикум помимо классических включает работы, выполняемые модельными компьютерными программами, что позволяет заменить дорогостоящее оборудование. Арсенал лабораторного оборудования позволяет нам проводить биофизические исследования обучающихся всех ступеней подготовки, писать научные статьи и участвовать в международных конференциях [3, 4]. Наиболее востребованы биофизические исследования в биотехнологии. Система образования в аграрном вузе имеет серьезные тенденции к инновациям, поэтому является способной решать многие задачи, связанные с сельским хозяйством, как по сырьевым ресурсам, так и их переработке. И значимый вклад в это вносит биофизика, развитие которой может обеспечить повышение качества подготовки выпускников-аграриев.

1. Белановский А.С. Основы биофизики в ветеринарии. М.: Дрофа, 2007. – 332 с.
2. Плутахин Г. А., Коцаев А. Г. Биофизика. СПб: Лань, 2012 – 240 с.
3. Мачнева, Н.Л. Стимуляция деления клеток *Chlorella vulgaris* наночастицами железа / Н. Л. Мачнева, Г.А. Плутахин, // International Conference «Physiology and Biotechnology of Microalgae», Moscow, October 16–19, 2012, – С. 35.
4. Набок М. Выпечка пшеничного хлеба с использованием в тестозамешивании электроактивированных водных растворов / М. Набок, Г. Плутахин // Хлібопекарська і кондитерська промисловість України. – 2009. – №9. – С. 38–41.

МАТЕМАТИКА И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИЧЕСКОМ ОБРАЗОВАНИИ

Mathematics and mathematical modeling in biophysical education

Ризниченко Г.Ю.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, стр. 12
+7(495)9391402, rznich@biophys.msu.ru

Современные биология и медицина все шире используют в фундаментальных исследованиях и прикладных разработках компьютерные модели, основанные на математических моделях и информационных технологиях. Для создания и осознанного использования и таких моделей от профессионала биолога требуется достаточно высокий базовый уровень знаний в области математики и математического моделирования.

Классические для преподавания в вузах основы математического анализа и теории дифференциальных уравнений, теории вероятностей и статистики представляют собой необходимый элемент культуры любого специалиста. Важно, чтобы в качестве примеров здесь использовались задачи, построенные на биологическом, экологическом, биотехнологическом материале. Для работы с математическими и компьютерными моделями сложных систем, каковыми являются объекты биологии, медицины, экологии, биотехнологии, необходимо иметь представление о результатах, полученных в областях математики, которые легли в основу современного междисциплинарного знания.

Методы и результаты качественной теории дифференциальных уравнений представляют собой математический базис таких современных наук как синергетика, нелинейная наука (Nonlinear Science), теория катастроф (Catastrophe Theory), теория хаоса (Chaos theory), теория сложных систем (Science of Complexity). Для этих областей ключевыми являются понятия устойчивости, аттрактора, следует знать свойства основных типов сложного поведения систем: колебательных, мультистационарных и квазистохастических режимов. Важным является понятие временных масштабов процессов в системе (теорема Тихонова о редукции систем ОДУ с «быстрыми переменными»). При рассмотрении уравнений в частных производных следует обсудить условия возникновения в системах разных типов автоволновых процессов и диссипативных структур.

Общий курс бакалаврской программы для студентов 2 курса биологического факультета МГУ «Биоинформатика и математическое моделирование в биологии» включает 24 лекции и 12 семинарских (практических) занятий, их содержание представлено на сайте mathbio.msu.ru/. Факультативно студенты отвечают на форуме на вопросы лектора. В завершение курса проводится студенческая конференция, на которой выступают лучшие студенты. Подготовку докладов курируют преподаватели семинаров.

1. Мятлев В.Д., Панченко Л.А., Ризниченко Г.Ю., Терехин В.А. Теория вероятностей и математическая статистика. Математические модели. Высшая математика и ее приложения к биологии. Университетский учебник. // М.: Изд. Центр Академия, 2009, 316 с.
2. Г.Ю.Ризниченко. Лекции по математическим моделям в биологии // М-Ижевск.:Изд. РХД, 2011, 560 с.
3. Плюснина Т.Ю., Фурсова П.В., Терлова Л.Д., Ризниченко Г.Ю. Математические модели в биологии: учебное пособие // М.-Ижевск, изд. РХД, 2014, 136 с.
4. Rubina A.B., Rznichenko G.Yu. Mathematical biophysics // Springer, 2014, 274 p

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ В УНИВЕРСИТЕТЕ КУРСОВ «БИОФИЗИКА» И «ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА»**Methodological aspects of teaching university course "Biophysics" and "Ecological Biophysics"**

Тулеханов С.Т.1, Инюшин В.М.1, Швецова Е.В.1, Кулбаева М.С.1

1 – Казахский национальный университет имени аль-Фараби, 050040, Алматы, Казахстан, Тел.: +7(727)377-36-06; +7(727)360-84-7»; e-mail: Sultan.Tuleuhanov@kaznu.kz

Традиционное преподавание курса «Биофизика» на третьем курсе для специальности 5В060700- Биология предполагает соблюдения определенных дидактических принципов, вызванных логикой самой науки Биофизики, в частности: – принцип качественной несводимости; принцип историзма, а также индукто – дедуктивный синтез. Курс «Экологическая биофизика» для специальности 5В060800-Экология читается в первом семестре первого курса. Оказалось, что в процессе адаптации студенты к новым учебным нагрузкам студенты переживают дидактический и профессиональный кризисы. Дидактический кризис вызывается увеличением требований к самостоятельной работе при изучении дисциплины. Профессиональный кризис связан с тем, что поступая на специальность Экология, студенты не предполагали необходимости хороших знаний по физике и химии. Принцип качественной несводимости – это требование учитывать специфические свойства живых систем. Принцип историзма отражает еще одну грань соотношения физики и биологии, где биофизическая интерпретация должна состоять не только в объяснении, как осуществляется то или иное биологическое явление в своей физической форме, но и каким путем, под воздействием каких факторов эволюции оно сформировалось. Смысл индукто – дедуктивного синтеза проявляется в том, что характерный для физики дедуктивный метод познания, через содержание взаимодействует с описательным индуктивным методом познания, характерным для биологии. Биофизическое исследование должно сочетать и то, и другое. Для реализации содержания биофизики описание истины биологического объекта не менее, а, может быть, даже более значимо, чем результаты, полученные методами точных наук. Концептуальными основами построения структуры и содержания учебного предмета «Биофизика» и «Экологическая биофизика» являются: – синтез физических и биологических знаний в ряде идей и теорий, дающих новое интегрированное содержание, повышающее теоретический уровень познания живого организма; – качественная несводимость живой и неживой материи при рассмотрении содержания биофизических теорий; – использование физического и биологического редукционизма при рассмотрении сложных биологических процессов в виде закономерного результата, включающего более простые физические и химические явления, или наоборот; – показ биофизического содержания в виде эволюционного развития биологических систем, так как жизнь во всех ее проявлениях – продукт эволюции; – преподавание биофизического содержания на основе индуктивно-дедуктивной метода познания, определяющего образовательную технологию изучения предмета; – структурирование содержания биофизического образования, используя модульный подход в обучении. Становится все более очевидным, что решение кардинальной проблемы соотношения физических и биологических форм движения материи лежит на пути синтеза физических и биологических представлений о живой и не живой материи. В образовательном процессе в зависимости от специальности и курса обучения он реализуется на различных уровнях.

Авторский указатель

Deriabina A	305	Асташева Е.В.....	344
Ferenczi M.A.....	53	Астраханова Т.А.....	345
Freiberg Arvi	8	Атакишиева С.А.....	253
Galanakis D.K.....	86	Ахмедов Н.А.....	66, 67, 312
Gonzalez Jimenez E.....	305	Ахмедов Н.Ф.....	67
Kristjan.....	8	Ахмедова С.Р.....	66, 67
Leiger	8	Ашихмин А.А.....	280
Mazat J.P.....	121, 288	Бабушкин А. В.....	333, 334
Narayanan T.....	53	Бажулина Н.П.....	20, 132, 136, 155
Palacios Corte V.....	305	Базановас А.Н.....	187
Poltev V.....	305	Байжуманов А.А.....	324
Ransac S.....	121, 288	Байрам-заде М.Р.....	253
Sengul A.....	150	Байрамова С.А.....	255
Solis Tobon M.....	305	Бакирова Д.Р.....	71, 86
Weisel J.W.....	86	Бакулев В.М.....	314
Аббаслы Р.М.....	60, 66, 312	Бакунина И.Ю.....	96
Аббасова Г.Д.....	296	Балабанова Л.А.....	96
Абдуллаев С.А.....	146	Балабин Ф.А.....	171
Абрамов А.Ю.....	371, 372	Балобан М.В.....	115
Абушик П.А.....	217, 359	Балобанов В.А.....	68
Аветисян А.В.....	246	Балтина Т.В.....	379
Авсиевич Т.И.....	228	Баранова О.А.....	333, 334, 336
Агаева Г.А.....	61, 62	Баранова Ю.Г.....	109
Агаева Л.Н.....	230	Барбин Н.М.....	297
Агаева У.Т.....	62	Барон А.В.....	331
Агутина Е. Ю.....	63	Барцев С.И.....	11
Адельянов А.М.....	166, 221	Баталова А.А.....	159
Айдаркин Е.К.....	9	Батурина Г.С.....	223
Айтназаров Р.Б.....	83	Батяновский А.В.....	36
Акименко М.А.....	350	Бахарев Б.В.....	346
Акулинка Д.В.....	247	Бахолдина С. И.....	79
Алексеев А.А.....	320	Бахромеева А. А.....	298
Алексеев Г.В.....	150	Бахтюков А.А.....	349
Алексеева О.М.....	167	Бачурин С.С.....	133
Алиев И.И.....	168	Башкиров П.В.....	172, 340
Алиев Р.Э.....	64	Безпрозванный И.Б.....	84, 355, 367
Алиев Э.З.....	74	Белая И.А.....	159
Али-заде Г.И.....	168, 254	Белевич Е.И.....	173, 219
Ананян А.А.....	169, 181	Белобров П.И.....	299
Андропова В.Л.....	20, 132, 136, 155	Белова Л.П.....	213
Анисимов В.М.....	152	Белослудцев К.Н.....	174, 175
Анкудинов А.В.....	238	Белослудцев М.Н.....	174
Антипов С.С.....	65, 110	Белослудцева Н.В.....	175
Антоненко Ю.Н.....	212, 220, 250, 303	Беляева Н.Е.....	42, 249
Антонов В. Ф.....	194	Бережная Е.В.....	352
Антонов С.М.....	217, 359	Бережнов А.В.....	24, 371, 372
Апашева Л.М.....	248	Бернхардт И.....	169
Апель Х.Ю.....	216	Бершицкий С.Ю.....	53, 235, 236
Апрышко В.П.....	135	Беспалова С.В.....	134, 300
Арнст Н.И.....	379	Бессолицына Е.К.....	69
Аскалпова О.И.....	133	Бирулина Ю.Г.....	176, 193, 207
Асташев М.Е.....	344	Бобкова Н.В.....	246

Богачев А.Н.....	301	Владимирский М.А.....	35
Богачева Е.Н.....	301	Власова О.Л.....	367
Богданова Л.Р.....	71	Внуков В.В.....	169, 181
Боздаганян М.Е.....	177	Вологжанникова А.А.....	75
Бозин Т.Н.....	111	Волохина И.В.....	77, 78
Бойко О.В.....	178	Волынский П.В.....	92
Болдырев А.Ю.....	147	Волынский П.Е.....	105
Болотина Л.Н.....	342	Воронин Д.П.....	302
Болотова А.А.....	182	Воронцов И.Е.....	32
Болычевцева Ю.В.....	247, 260	Вчерашняя А.В.....	198
Бондарь В.С.....	331	Вышенская Т.В.....	182
Борисова А.Г.....	304	Габбасова Д.Т.....	320
Борисова М.П.....	190	Гавриленко Т.В.....	356, 373, 374
Боровиков Ю.С.....	240	Гавришева А.И.....	251
Бороновский С.Е.....	121, 188, 272, 288, 361	Гаджиева Л.С.....	60, 296
Бочаров Э.В.....	111	Газиев А.И.....	146
Браже А.Р.....	347	Галандарли И.З.....	168
Браже Н.А.....	324	Галегов Г.А.....	20, 132, 136, 155
Бражников Е.В.....	89	Галзитская О.В.....	130
Братковская Л.Б.....	320	Галимзянов Т.Р.....	340
Бржевская О.Н.....	275	Галкина О.В.....	349
Брусков В.И.....	70	Галль Л.Н.....	18
Бубликов Г.С.....	115	Галочкина Т. В.....	183
Буглак А.А.....	30	Гамилов Т.М.....	14
Будкевич Р.О.....	186	Ганиева Р.А.....	255
Будянская Л.В.....	180	Гарбер М.Б.....	95, 102, 103, 142
Букреев А.В.....	273	Гарбузинский С.А.....	52
Булай П.М.....	354	Гарбузинский С.А.....	99
Булычев А.А.....	12, 179, 278	Гармаева С.Б.....	135
Буров О.Н.....	133	Гармаза Ю.М.....	184
Бутов С.Н.....	199	Гарсиа Д.....	152
Бучельников А.С.....	137, 302	Гасанов Р.А.....	255
Бушуева А.В.....	286	Гасанова А.Э.....	185
Бывшев И.М.....	246	Гаспирович В.В.....	286
Бычкова В.Е.....	68	Гахова Э.Н.....	51
Вагабова М.Р.....	74	Гахокидзе Р.А.....	72
Валиуллина Ю.А.....	71	Гендель Л.Я.....	206
ван Луйтелаар Э.....	370	Глухов А.С.....	101
ван Хок М.Л.....	35	Глухов Г.С.....	303
Василевский Ю.В.....	14	Глухова К.А.....	76
Васильев А.Н.....	233	Гоголев Ю.В.....	69, 125
Васильев Н.С.....	189	Годжаев Н.М.....	62, 230
Васильева-Вашакмадзе Н.С.....	72, 73	Голиченков В.А.....	241
Вафина Г.Х.....	122	Голотин В.В.....	96
Ващенко О.В.....	180	Голощаров А.Н.....	337
Ведунова М.В.....	345, 348, 363, 364, 380, 381	Голубева Т.Б.....	202
Веланский П. В.....	79	Гольшев С.А.....	201, 202
Велиева Л.И.....	74	Гонгадзе Г.М.....	142
Великанов Г.А.....	213	Гонсалес Е.....	152
Вердиян Е.Э.....	33	Гонсалес Хименес Э.....	305
Верхуша В.В.....	115	Гончарова А.А.....	369
Вечтомова Ю.Л.....	30	Горбачева Л.Р.....	182, 208, 285
Вильчинская Н.А.....	292	Горбунов Д.В.....	374
Винокуров Л.М.....	45	Горина С.С.....	69
Вихлянцев И.М.....	229	Городецкая М.В.....	328

Горохов В.В.....	277	Еланская И.В.....	247
Горюнов А.С.....	112, 304	Ел-Мохнави Е.....	260
Гостев Ф.Е.....	273, 291	Ермакова Е.А.....	82, 125
Гранкина А.О.....	350	Ермилова В.С.....	69
Григоренко В.В.....	373, 374	Ермолаев В.И.....	83
Григорьева А.А.....	135	Еськов В.В.....	356, 373, 374
Гринкевич Л. Н.....	351	Еськов В.М.....	356, 373, 374
Гришанова Н.П.....	277	Ефимов В.В.....	341
Гроховский С.Л.....	132	Ефремов Р.Г.....	23, 85, 92, 105, 127, 153, 203
Гроховский С.Л.....	20, 37, 136, 155	Ефремова А.С.....	208
Гудимчук Н.Б.....	106	Ещенко Н.Д.....	349
Гудков С.В.....	70, 344	Жадин М.Н.....	346
Гулин А.А.....	291	Жемков В.А.....	84
Гуляев Ю.В.....	316, 318, 330	Жердев А.В.....	335
Гурвиц Б. Я.....	63	Жигачева И.В.....	256
Гурский Г.В.....	132, 136, 155	Жмак М.Н.....	127
Гурский Я.Г.....	20, 132, 136	Жондарева Я.Д.....	257
Гусакова С.В.....	176, 193, 207	Жулябина О.А.....	138
Гусев Ю.С.....	77, 78	Журикова Е.М.....	259
Гуськова Р.А.....	189	Журкин Д.В.....	211
Гуценко О.И.....	181	Жухлистова Н.Е.....	114
Давлетшина Л.Н.....	252	Зайцев К.С.....	188
Давыдова Л. А.....	79	Зак П.П.....	202
Дадашева С.Б.....	253	Замалетдинов М.Ф.....	85
Даниленко А.О.....	181	Заседателей А.С.....	161
Девяткин А.А.....	218	Захаров Н.А.....	308
Дегтярев Е.Н.....	275	Захаров П.Н.....	106
Деев Л.И.....	324	Захарова Л.Я.....	160
Деева А.А.....	80	Захарова Т.В.....	308
Дементьева О.В.....	309	Захидов С.Т.....	309
Демидов В.Н.....	315	Зверев В.В.....	298
Демченков Е. Л.....	186	Зейналова Н.М.....	254
Демьяненко С.В.....	352, 353	Зеленина И.А.....	309
Денисов А. А.....	354	Зелепуга Е.А.....	139
Денисов С.С.....	250	Зленко Д.В.....	183, 222, 258, 321
Дерябина А.....	152, 305	Золотарёва Е.К.....	279
Дерябина А.С.....	305	Золотарёва Е.К.....	274, 283
Джалилова А.Р.....	254	Зорин В.П.....	342
Джафарова Дж.Р.....	255	Зорин Н.А.....	290
Джафик Е.....	260	Зубрицкая Г.П.....	184
Джелядин Т.Р.....	154	Зуев Ю.Ф.....	82, 86, 125, 160, 310
Джелядин Т.Р.....	157	Зуева О.С.....	310
Дзантиев Б.Б.....	335	Иваницкий Г.Р.....	26
Добржанская А.В.....	240	Иванов А.В.....	25
Довидченко Н.В.....	130	Иванов Б.Н.....	259
Долгов А. А.....	306	Иванов В.Е.....	70
Долгов А.А.....	301	Иванов И.А.....	127
Донцова О.А.....	145	Иванов И.И.....	189
Дубинин М.В.....	174	Иванов М.В.....	179
Дурыманов М.О.....	46	Иванов Р.С.....	122
Дьяконова А.Н.....	42, 81	Иванова О.Н.....	25
Евстигнеев В.П.....	137, 307	Иванова Э.А.....	122
Евстигнеев М.П.....	137, 302, 307	Ивашина Т.В.....	45
Евстифеев А.И.....	187	Игнатова Л.К.....	259
Егорова П.А.....	355	Идиятуллин Б.З.....	82, 86
Ежова Ж.А.....	308	Иконников Е.О.....	311

Илатовский В.А.....	281, 282	Коваленко Т.А.....	195
Иловайский А. И.....	216	Коваль Е.М.....	308
Ильичева И.А.....	37	Ковель Е.С.....	332
Ильченко С.А.....	87	Козлова Н.М.....	219
Инюшин В.М.....	389	Козловская Э.П.....	139
Ионенко И.Ф.....	213	Кокшаров Ю.А.....	316, 318, 330
Ирибэ Г.....	242	Колчанов Н.А.....	27
Исаева М.П.....	104	Комаров В.М.....	140
Исакина М.В.....	357, 358	Комарова А.В.....	12, 179
Исмаилов Р.И.....	88	Комарова С.А.....	384
Исмаилова Л.И.....	60, 66, 312	Комиссаров Г.Г.....	248, 264, 265, 270, 281, 282
Кабанов А.В.....	140	Кондратьев М.С.....	338
Кабанов А.В.....	91, 129	Кондратьев М.С.....	140
Казаков А.С.....	75, 88	Кондратьев М.С.....	91, 129
Казаринов К. Д.....	333, 334	Коневета А.Л.....	141, 145, 151
Казаринов К.Д.....	319, 328, 336	Контаров Н.А.....	298
Казначеева Е.В.....	369	Конюхов И.В.....	249, 289
Камзолова С.Г.....	154	Копчак М.....	260
Камзолова С.Г.....	157	Копылова Г.В.....	53, 232
Канаш Ю.С.....	184	Корепанов А.П.....	142
Канев И.Л.....	313	Корепанова Е. А.....	194
Канев И.Л.....	35	Корниенко И.В.....	133
Карапетян Н.В.....	260	Коробейников В.А.....	160
Каргатов А.М.....	89	Коробейникова А.В.....	142
Карелина Т.В.....	217, 359	Королева В.А.....	317
Карп О.Е.....	70	Коршунова Г.А.....	250
Касацкий П.С.....	145	Костарева О.С.....	102
Касумов Р.Э.....	261, 262	Костин Д.Г.....	173
Касумов Э.А.....	261, 262	Костылева Е.....	158
Касумова И.В.....	261, 262	Котов Н.В.....	187
Касьяненко Н.А.....	147, 150, 311, 314, 315	Котова Е.А.....	220, 250
Касян Н.А.....	180	Котова Я.Н.....	204
Катаев А.А.....	190	Кофанова О.А.....	361
Катина Н.С.....	68	Кочетков С.Н.....	25
Каткова Л.Е.....	223	Коцаев А. Г.....	387
Каурова С.А.....	51	Кравцова В.В.....	233
Кашеверов И.Е.....	127	Крайский А.А.....	196
Кашпаров И.А.....	100	Крайский А.В.....	196
Кижеватова Е.А.....	360	Красильников П.М.....	258
Ким В.П.....	316, 318, 330	Красильникова И.А.....	182, 208
Ким М.В.....	84	Красникова А.О.....	180
Ким Н.Ю.....	96, 104	Красновский А.А.....	29, 266
Ким Ю.А.....	167	Кратасюк В.А.....	80
Кириллова И.Г.....	263	Кременцова А.В.....	167
Кириченко Е.Ю.....	350, 378	Кретушев А.В.....	182
Киселев С.С.....	140	Кривандин А.В.....	337
Кит О.И.....	191	Кривой И.И.....	233
Клемяшов И.В.....	192, 231	Крикунова Н.И.....	256
Кленина И.Б.....	280	Крупенина Н.А.....	179
Клецкий М.Е.....	133	Крупянский Ю.Ф.....	120
Клинов Д.В.....	340	Крупянский Ю.Ф.....	119
Ковалев И.В.....	176, 193, 207	Крутецкая З.И.....	199
Ковалева А. А.....	194	Крутецкая Н.И.....	199
Ковалева В.Д.....	352	Крылов Н.А.....	105
Коваленко И.Б.....	42, 90, 123, 183, 222	Кубасова Н.А.....	53

Кувичкин В.В.....	143	Мазиллов С.И.....	77, 78
Кудрявцев Д.С.....	127	Мазуров М.Е.....	362
Кудряшева Н.С.....	332	Майорова В.Е.....	216
Кузнецов А.В.....	318	Максимов А.Ю.....	191
Кузнецов А.С.....	85, 92	Максимов Е.Г.....	277
Кузнецова Е.П.....	147	Максимова Е.М.....	142, 145
Кузнецова И.М.....	93, 107, 115, 116, 117, 118, 124	Мальшко Е.В.....	87
Кузьмин П.И.....	172, 340	Мамедов М.Д.....	277, 291
Кулаков С.В.....	376, 377	Манухин Б.Н.....	178, 366
Кулаковский И.В.....	32	Маньковская И.Н.....	200
Кулбаева М.С.....	389	Маречек С.В.....	319, 336
Кулинич А.В.....	144	Мartiнович Г.Г.....	197, 198
Кульминская А.А.....	84	Мartiнович И.В.....	198
Кумахова Т.Х.....	278	Марченко Н.Ю.....	97, 98, 99, 100
Куранова И.П.....	108, 114	Марченков В.В.....	97, 98, 100
Курбанова И.М.....	253	Маршак Т.Л.....	309
Куркина Т.А.....	191	Маслаков А.С.....	42
Курсанов А.Г.....	234	Маслов В.Г.....	126
Кутько А.Г.....	184	Маторин Д.Н.....	320
Лавриненко И.А.....	94	Матюшенко А.М.....	53
Ладыгин В.Г.....	267, 268	Махнева З.К.....	280
Лапшин Г.Д.....	45	Махно В.И.....	145
Лауринавичене Т.В.....	251	Махновский Д.А.....	365
Лахно В.Д.....	31	Машковцева Е.В.....	272
Левин Г.Я.....	225	Медведев М.А.....	193
Левицкий Д.И.....	53	Медвинский А.Б.....	34
Легенький Ю.А.....	134, 300	Межевикина Л.Ф.....	17
Лейченко Е.В.....	139	Мелехов В.В.....	65, 110
Лекишвили Г.Н.....	72	Мельник Б.С.....	76, 101
Леконцева Н.В.....	95, 98, 103	Мельник Т.Н.....	76, 101
Лемак М.С.....	269	Мельникова А.А.....	379
Лепехина С.Ю.....	155	Мельникова Г.Б.....	322
Ли Кисун.....	41	Мельницкая А.В.....	199
Линдблад К.Н.....	35	Милютин Н.П.....	169, 181
Линькова Н.С.....	147	Минкабирова Г.М.....	146
Лисецкий Л.Н.....	180	Мирзабеков Т.А.....	88
Лисина О.Ю.....	182	Миронова А.Г.....	135
Литвинов Р.И.....	86	Миронова Г.Д.....	175, 200
Лихацкая Г.Н.....	96, 104	Миронова Т.Т.....	196
Лобанов А.В.....	248, 270	Митрошина Е.В.....	345, 348, 363, 364, 381
Ловягина Е.Р.....	271	Михайлина А.О.....	102, 103
Логвинов А.К.....	350, 378	Михайлов К.М.....	273
Логинова О.О.....	317	Михайлов Н.В.....	109
Лойко Н.Г.....	120	Михайлов Р.В.....	88
Локтюшкин А.В.....	189	Михалева М.Г.....	321
Ломоносова Ю.Н.....	292	Михаловский И.С.....	322
Лосев А.А.....	140	Михеев А.Ю.....	323
Лукашев Е.П.....	325	Михеев А.Ю.....	35
Лукьяненко Л.М.....	214	Мишарина Т.А.....	256
Лунева О.Г.....	206	Мищенко Т.А.....	348, 363, 364, 380, 381
Лысенко Е.П.....	385, 386	Моисеева Е.Д.....	20, 132, 136
Любарцев А.П.....	210, 211	Моисеева Е.М.....	77
Людникова Т.А.....	30	Мокросноп В.М.....	274
Люттйоханн А.....	370	Молчанов П. Г.....	354
М.Л. Степанов.....	284	Монастырная М.М.....	139
Магеррамова Х.Х.....	168	Морозов В.Н.....	35, 313, 323

Морозов В.Н.....	162	Ожередов В.А.....	221
Морозова Е.А.....	147	Озолинъ О.Н.....	65, 110
Морозова Е.Н.....	293	Олейников В.А.....	325, 326
Морозова Т.Я.....	35	Ольшанникова С.С.....	317
Морошкина Е.Б.....	148, 149	Омельченко В.П.....	360
Москаленко А.А.....	280	Опанасенко В.К.....	259
Москвин А.С.....	237, 243	Орлов О.Ю.....	201, 202
Мосунов А.А.....	302	Орлов С.Н.....	193, 205
Мочалов К.Е.....	325, 326	Орлова М.В.....	106
Мошков К.А.....	126	Осин Ю.Н.....	310
Муджири Н.М.....	309	Осинникова Д.Н.....	148, 149
Мудров В. П.....	333, 334	Осолодков М.И.....	315
Мурзина Г.Б.....	365	Остерман И.А.....	145
Мурина В.Н.....	95, 98	П.М. Красильников.....	284
Мусаев Н.А.....	185	Павельев М.Н.....	379
Мухина И.В.....	345, 348, 363, 364, 380, 381	Павленова К.Н.....	150
Мухтарова Л.Ш.....	69	Паласиос Кортэ В.....	305
Мысягин С.А.....	293	Панарин Е.Ф.....	314
Мэнтель В.....	260	Панина И.С.....	203
Набиев И.Р.....	325	Пантелеев М.А.....	195, 204
Набиев С.Р.....	53, 232, 235, 236	Паршина Е.Ю.....	205, 206
Нагибина Г.С.....	101	Пашкова И.С.....	302
Наджафалиева Ш.А.....	185	Пащенко В.З.....	277
Надточенко В.А.....	273, 291	Пеннийнен В.А.....	238
Назарова О.В.....	314	Пеньков Н.В.....	128
Нарциссов Я.Р.....	121, 188, 272, 288, 361	Пермяков Е.А.....	39, 75, 88
Наседкина Т.В.....	161	Пермяков С.Е.....	75, 88
Нвабуэзе А.О.....	35	Персиянцева Н.А.....	208
Негинская М.А.....	352	Песик Я.....	302
Неделина О.С.....	275	Петрова И.В.....	207
Некрасова Т.Н.....	314	Петрович В.А.....	219
Немцева Е.В.....	80	Печникова Е.В.....	303
Нестеренко А.М.....	183, 222	Пивоваров А.С.....	365
Нестерова Л.А.....	366	Пикуленко М.М.....	278
Нечаев В.В.....	276	Пинелис В.Г.....	182, 208, 285
Нечипуренко Д.Ю.....	37	Питлик Т.Н.....	354
Нечипуренко Ю.Д.....	37	Плотникова Ю.И.....	287
Никельшпарг Э.И.....	324	Плутахин Г. А.....	387
Никерясова Е.Н.....	241	Плюснина Т.Ю.....	42, 289
Никитин А.М.....	20, 132, 136	Поварницына Т.Н.....	101
Никитина Л.В.....	232	Поварова О.И.....	93, 107
Николлаев Е.Н.....	38	Погосян С.И.....	40, 249, 289
Никонов О.С.....	103	Подоплелова Н.А.....	204
Никонов С.В.....	95, 102	Подшивалов Д.Д.....	108
Никонова Е.Ю.....	103	Позмогова Г.Е.....	340
Никулин А.Д.....	95	Покровский А.Г.....	160
Новикова Е.М.....	287	Полесскова Е.В.....	145, 151
Новикова О.Д.....	79, 104	Полешко А.Г.....	17
Новоселов В.И.....	128	Полищук А.В.....	274
Нольде Д.Е.....	105, 203	Полищук А.В.....	279
Носарев А.В.....	176, 193	Полников И.Г.....	319, 328, 336
Нуриева Н.И.....	34	Полозов Р.В.....	37
Нурминский Е.А.....	96	Полтев В.И.....	152, 305
Овсянников Д.А.....	235, 236	Полтева Н.А.....	152
Овчаренко Е.Н.....	248	Поляничко А.....	109, 158, 159

Поляничко А.М.....	109, 159	Рудковский М.В.....	375
Полянский А.А.....	92	Рудой В.М.....	309
Попов А.Л.....	329	Русаков А.В.....	34
Попов И.А.....	38	Рывкин А.М.....	237, 243
Попова Н.Р.....	70, 329	Рычков Г.Н.....	117
Поповичева А.Н.....	225	Рябова Н.А.....	97
Попугаева Е.А.....	367	Рязанцева М.А.....	369
Попцова М.С.....	37	Савина М.А.....	83
Порнягина О.Ю.....	79	Савинкова И.Г.....	208, 285
Портнягина О.Ю.....	104	Савицкий А.П.....	45
Постников В.А.....	196	Садреев И.И.....	187
Потапенков К.В.....	316, 318, 330	Салецкий А.М.....	316
Преображенская Е.В.....	110	Сальников В.В.....	310, 341
Приезжев А.В.....	41	Самойлов М.В.....	322
Прилуцкий Ю.И.....	302	Самосудова Н.В.....	201
Присный А.А.....	209	Самохин А.Н.....	246
Проскурин С.Г.....	228	Самсонов М.В.....	238
Проскуряков И.И.....	280	Самченко А.А.....	140
Протопопова А.Д.....	340	Самченко А.А.....	91
Прямоносов Р.А.....	14	Санина Н. М.....	79
Птицын Г.А.....	281, 282	Санчес К.....	152
Птицын К.Г.....	292	Сапунов Г.А.....	24
Пчицкая Е.И.....	367	Сарычева А.С.....	324
Пыркова Д.В.....	153	Сачкова А.С.....	332
Рабинович А.Л.....	210, 211	Свешникова А.Н.....	171, 204
Рагимова С.Н.....	185	Селиванова О.М.....	130
Рассказов В.А.....	96	Семенихин А.В.....	283
Растрыгина В.А.....	88	Семенов А.Ю.....	291
Рахбанова З.М.....	206	Семёнова Г.А.....	268
Рахнянская А.А.....	316	Сёмин Б.К.....	252, 271
Ревин В.В.....	218, 357, 358	Сёмин Ф.А.....	239
Ревина Н.В.....	358	Семина В.И.....	251
Ревина Э.С.....	357	Семисотнов Г.В.....	97, 98, 100, 113
Регнер М.....	260	Сергиев П.В.....	145
Резников И.И.....	385, 386	Сережникова Н.Б.....	202
Ривас Ф.....	152	Сибаров Д.А.....	217, 359
Рогинский Д.О.....	116	Сибгатуллин Т.А.....	213
Рогожин Е.А.....	111	Сидорова О.В.....	104
Рогозин М.М.....	225	Сидоров-Бирюков Д.Д.....	114
Родионова Н.Н.....	33	Силичева М.А.....	205, 206
Роднина М.В.....	145, 151	Силонов С.А.....	124
Рожков А.Ю.....	350	Симаков С.С.....	14
Рожков С.П.....	112, 304	Симоненко Е.Ю.....	135
Рожкова Н.Н.....	304	Симонян Р.А.....	246
Розенбаум Ю.А.....	207	Синицын Д.О.....	120
Розенкранц А.А.....	46	Сиренко В.В.....	240
Розова Е.В.....	200	Ситдикова А.К.....	124
Рокицкая Т.И.....	212	Ситникова Е.Ю.....	370
Ролич В.И.....	311	Ситницкий А.Э.....	86
Романов Н.М.....	109	Скобелева К.В.....	369
Ронжин Н.О.....	331	Скоробогатова А.С.....	214
Россохин А.В.....	368	Скурида В.Д.....	87
Рочев Ю.А.....	44	Слепченко Л.В.....	96
Рубакина В.А.....	137	Смаглий Л.В.....	176, 193
Рубцова Н.А.....	248	Смирнова Е.О.....	69
Руденко Н.Н.....	259	Смирнова О.А.....	25

Созонова А.А.	109	Титова В.Ю.	121, 288
Соколов А.С.	75, 88	Тищенко С.В.	102
Соколов В.С.	216	Тоидзе П.Л.	72
Соколов П.А.	315	Толстыко Е.А.	315
Соколова О.С.	47, 303	Топоркова Я.Ю.	69, 125
Соленов Е.И.	223	Травкина В.И.	149
Солис Тобон М.	305	Тренина М.Б.	256
Соловьева Д.О.	325	Тренкеншу Р.П.	257
Соловьева О.Э.	48, 234, 242	Трифонов Е.В.	96
Соловьёва О.Э.	237, 243	Тропынина Т.С.	122
Соловьева Т.Ф.	104	Трубачева О.А.	207
Соловьева Э.Ю.	333, 334	Тулеуханов С.Т.	389
Солопов М.В.	134, 300	Турочеров К.К.	93, 107, 115, 116, 117, 118, 124
Сорокин А.А.	154	Туровская М.В.	24
Сорокин А.А.	157	Туровский Е.А.	24
Сотников Д.В.	335	Турчина А.И.	68
Стадничук И.Н.	258	Тюкавин В.И.	316, 318, 330
Старкова Т.	158	Тюнина О.И.	170
Стародубов С.М.	241	Уверский В.Н.	93
Степаненко Олеся В.	115, 116	Узденский А. Б.	50
Степаненко Ольга В.	116	Улитин А.Б.	88
Степаненко Ю.Д.	217, 359	Ульянов Е.В.	106
Степанов А.С.	120	Унксов И.Н.	314
Стефанов В.Е.	126	Усачева А.М.	70
Стовбун С.В.	321	Усманов Н.Н.	316
Страховская М.Г.	222	Устинин Д.М.	42
Суворова М.Ю.	130	Ушаков А.М.	340
Суковатый Л.А.	80	Файзуллин Д.А.	82, 125, 160
Сулацкая А.И.	107, 117, 118	Файкин В.В.	316, 318, 330
Султанов Т.Т.	196	Фалеева Т.Г.	133
Сурин А.К.	76, 130	Фаткуллина Л.Д.	337
Сурин А.М.	182, 208, 285	Федин А.И.	333, 334
Сурова Л.М.	286, 293	Федоров В. А.	123
Суровая А.Н.	20, 132, 136, 155	Федорчук Т.П.	259
Сухов В.С.	286, 287, 293	Федотова Е.И.	371, 372
Сухоруков Г.Б.	329	Федулов Ю. П.	387
Сыбачин А.В.	316, 318, 330	Фесенко Д.О.	161
Сысоев И.В.	370	Филатов И.В.	36
Сысоева М.В.	370	Филатов М.А.	373
Сюсин И.В.	218	Филатова Е.В.	191
Табакмахер В.М.	127	Филатова О.Е.	356, 374
Тамашевский А.В.	184, 215	Филимоненко Д.С.	219
Таранов И.В.	316, 318, 330	Филимонов В.В.	95, 98
Тарасевич В.А.	322	Финкельштейн А. В.	52
Тарасов Г.В.	96	Фирсов А.М.	220
Тарасова Н.Б.	125	Фонин А.В.	124
Тарнопольска О.В.	191	Фролов А.Е.	289
Ташкин В.С.	216	Фролов В.А.	172
Телегина Т.А.	30	Фролов С.В.	228
Темлякова Е.А.	80, 154, 157	Фролова М.С.	372
Теплов И.Ю.	24, 371	Хавинсон В.Х.	147
Терехова И.В.	260	Хадарцев А.А.	356
Терешкина К.Б.	119, 120	Хайрутдинов Б.И.	82, 125
Тимофеев В.И.	108, 114	Хайтин А.М.	375
Титов С.В.	336	Халилов Р.И.	254

Халисов М.М.....	238	Шишкина Т.В.....	348, 364, 381
Хамицаев А.К.....	221	Шишков А.В.....	301
Харыбина З.С.....	376	Шишова Н.В.....	51
Хечинашвили Н.Н.....	91	Шляпников Ю.М.....	35
Холина Е.Г.....	222	Шляпников Ю.М.....	162
Холявка М.Г.....	91, 317, 338	Шляпникова Е.А.....	35
Хоменко В.А.....	104	Шляпникова Е.А.....	162
Хомочкин А.П.....	283	Шматченко В.В.....	130
Хомутов Г.Б.....	156, 316, 318, 330, 339	Шныров В.Л.....	79
Хорн П.А.....	75	Шрам С.И.....	208
Хохлова А.Д.....	242	Шубин В.В.....	260
Хрущев С. С.....	123	Шувалов В.А.....	56
Цетлин В.И.....	127	Шюкюров Н.М.....	67
Цукерман В.Д.....	376, 377	Щепкин Д.В.....	53, 232
Цыганков А. А.....	290	Щербачков К.А.....	129
Цыганков А.А.....	251	Щербачкова Д.М.....	115
Цымпилов В.С.....	223	Щукина В.Д.....	111
Чеканов А.В.....	333, 334, 336	Эльман К.А.....	374
Чекашкина К.В.....	172, 340	Эль-Регистан Г.И.....	120
Черенков Д.А.....	91	Юдин Н.С.....	83
Черепенин В.А.....	316, 318, 330	Юминова Н.В.....	298
Чернавская О.Д.....	54	Юрина Н.П.....	247
Черников А.В.....	70	Юртаева С.В.....	341
Чернозатонский Л.А.....	275	Юсипович А.И.....	205
Черткова Р.В.....	68	Яковенко Л.В.....	166, 226
Чжан Цюши.....	315	Яковенко С.А.....	135
Чижов Ю.В.....	126	Яковец И.В.....	342
Чирков А.А.....	297	Яковлева Е.И.....	380
Чистюлин Д.К.....	104	Якушевич Л.В.....	163
Чистяков А.А.....	325	Янковский И.В.....	342
Чихиржина Е.....	109, 158, 159	Япаров Б.Я.....	243
Чихиржина Е.В.....	109, 159	Ярославов А.А.....	316, 318, 330
Чугунов А.О.....	105, 127, 203		
Чумаков М.И.....	77, 78		
Чурилов Г.Н.....	332		
Чурюмова Г.А.....	350, 378		
Шадрин Г.А.....	373		
Шадыро О.И.....	198		
Шайхутдинов Н.М.....	379		
Шарапов М.Г.....	128		
Шарифулина С.А.....	352		
Шаронов Г.В.....	224		
Шастик Е.С.....	290		
Шаталова О.В.....	337		
Швецова Е.В.....	389		
Шевченко М.А.....	196		
Шевченко А.В.....	191		
Шелаев И.В.....	273, 291		
Шелудько Н.С.....	240		
Шенкман Б.С.....	292		
Шереметьев Ю.А.....	225		
Шерстнева О.Н.....	286, 293		
Шибряева Л.С.....	167		
Ширинский В.П.....	238		
Широкова О.М.....	380		
Шихлярова А.И.....	191		

Научное издание

**V СЪЕЗД
БИОФИЗИКОВ РОССИИ
4-10 октября 2015 г.**

**МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ
том 1**

Подписано в печать 10.09.2015. Заказ № 4690.

Формат 60×84 1/2. Усл. печ. л. 23,13. Уч.-изд. л. 28,74. Тираж 500 экз.

Издательство Южного федерального университета.

Отпечатано в отделе полиграфической, корпоративной и сувенирной продукции

Издательско-полиграфического комплекса ЮНБМ МЕДИА ЦЕНТРА ЮФУ

344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Ставрак. 200/1, тел. (863) 247 80-51.

Sigma-Aldrich®

легендарное качество и широчайший выбор химических реактивов

в том числе:

- антитела
- антибиотики
- клеточные культуры
- ингибиторы
- ферменты/субстраты
- нуклеотиды
- белки, пептиды
- буферы
- липиды, углеводы
- красители

ООО «Сигма-Алдрич Рус»
105062 Москва, ул. Макаренко,
д-2/21, стр. 1, оф. 22.
Тел: 8-800-100-7425,
E-mail: ruorder@sial.com

sial.com/russia

SIGMA ALDRICH Fluka SUPELCO SANC

SIGMA-ALDRICH®



Микрофлюидика Dolomite

АНАМ

Микрофлюидика **Dolomite** позволяет работать с очень малыми количествами жидкостей, газов, частицами, каплями, клетками животного, растительного и бактериального происхождения с возможностью наблюдать, управлять и контролировать процессы. Это дает возможность проводить «традиционные» исследования в миниатюрном формате, а также проводить исследования, которые ранее были невозможны.

Особенности и возможности микрофлюидики **Dolomite**

- работа с микро- и нанобъемами (диаметр канала от 10 нм);
- высокая воспроизводимость: точность дозирования – порядка пиколитра;
- точный контроль параметров процесса: температуры, скорости потоков, давления, смешивания;
- большая библиотека «стандартных» чипов;
- чипы произвольной конфигурации и геометрии: многослойные и составные чипы с разными свойствами поверхности каналов, интеграция на одном чипе различных стадий процессов для ускорения и автоматизации методик исследований;
- интеграция с приборами, детекторами, системами пробоподготовки и сенсорами (хроматографами, масс-спектрометрами, лазерами, спектрофотометрами, микроскопами и т.д.).



Биология, диагностика и медицина

- кристаллизация белков (для рентгеноструктурного анализа);
- качественный и количественный анализ фрагментов НК на чипе капиллярного электрофореза;
- чипы для секвенирования НК;
- цифровая капельная ПЦР для количественной ПЦР-диагностики с высокой точностью;
- анализы крови (биохимические, ИФА, на глюкозу и т.д.);
- изоляция ДНК из цельной крови;
- наблюдение за иммобилизованными эмбрионами и клетками.

Москва ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru ■ www.dia-m.ru

Новосибирск

пр. Ассад,
Парентьева, 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань

ул. Парашевой,
Камуны, д. 6
тел./факс:
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Санкт-Петербург

ул. Профессора
Попова, 23
тел./факс:
(812) 372-0040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону

пер. Сеняко, 114
тел./факс:
(863) 250-0006
rd@dia-m.ru

Пермь

Представитель
и УФО
тел./факс:
(342) 202-2238
perm@dia-m.ru

Воронеж

тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru