

Организаторы

Федеральное агентство научных организаций

Биологическое отделение РАН

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Совет молодых ученых и специалистов ИТЭБ РАН

Программный комитет

Председатель

Проф., д.б.н. Белецкий И.П., Директор ИТЭБ РАН

Со-председатель

Проф., д.ф.-м.н. Медвинский А.Б., зав. лаб. Биофизики возбудимых сред ИТЭБ РАН

Ученый секретарь

к.б.н. Попова И.Ю., Ученый секретарь ИТЭБ РАН, ИТЭБ РАН

к.ф.-м.н. Кондратьев М.С., зав.лаб., ИБК РАН

к.б.н. Мальков А.Е., н.с., ИТЭБ РАН

к.б.н. Осипов А.А., с.н.с., ИВНД РАН, ИБК РАН

к.ф.-м.н. Шляпников Ю.М., с.н.с., ИТЭБ РАН

к.б.н. Сорокина С.С., н.с., ИТЭБ РАН

Организационный комитет

к.б.н. Попова И.Ю., ИТЭБ РАН

к.б.н. Сорокина С.С., ИТЭБ РАН

к.б.н. Ермаков А.М., ИТЭБ РАН

к.б.н. Мальков А.Е., ИТЭБ РАН

к.б.н. Осипов А.А., ИВНД РАН, ИБК РАН

к.б.н. Фахранурова Л.И., ИТЭБ РАН

Оглавление

Организаторы.....	1
Программный комитет.....	1
Организационный комитет.....	1
Биофизика клетки.....	5
1. Влияние бета-амилоидных пептидов на показатели энергетического обмена и концентрацию 2,3-дифосфоглицерата в разной популяции эритроцитов крыс.....	5
2. Исследование влияния экзогенного кальция на структурно-функциональное состояние лимфоцитов человека.....	6
3. Исследование изменений функциональной активности каспазы-8 лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ-света и пероксида водорода.....	7
4. Мутантный альфа-синуклеин вызывает митохондриальную дисфункцию и гибель нейронов.....	8
5. Ожирение вызывает недостаточность функциональной экспрессии внутриклеточных рецепторов-каналов в белых адипоцитах мыши.....	9
6. Оптический пинцет как инструмент исследования ядерных структур ооцитов мыши.....	10
7. Состояние мезентеральных сосудов при ишемически-реперфузионном поражении тонкого кишечника крысы.....	11
Теоретическая биофизика и биоинформатика.....	12
8. Анализ динамических характеристик ДНК для промоторов бактериофага T7.....	12
9. Ген <i>umjA</i> <i>E. coli</i> является матрицей для синтеза мРНК и аРНК, которые процессируются РНКазой Rng.....	13
10. Интерфейс мозг-компьютер замкнутого типа для управления инвалидным креслом.....	14
11. К вопросу о несинонимичности синонимических замен.....	15
12. О проблемах экологического моделирования в контексте решения парадокса биоразнообразия.....	16
13. Предсказания промоторов <i>e.coli</i> с помощью динамических характеристик открытых состояний днк методами машинного обучения.....	17
14. Роль электростатики в регуляции транскрипции прокариот. Новый древний фактор естественного отбора в геноме.....	18
15. Транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии в статистиках <i>Helix lucorum</i> в условиях микрогравитации.....	19
Биофизика одиночных молекул. Нанобиотехнологии.....	20
16. Анализ влияния полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных цитрат-стабилизированными наночастицами $Ce_{1-x}GdxO_{2-x}$, на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток человека <i>in vitro</i>	20
17. Исследование <i>in vitro</i> цитотоксичности и адгезионных свойств нанопаст на основе кальций-фосфатных соединений, предназначенных для реконструктивной хирургии костной ткани.....	21
18. Квантово-химический конформационный и термодинамический анализ структур 20 протеиногенных L-аминокислот и их кремниевых аналогов.....	22

19. Конструирование потенциальных биосенсоров на основе бактерии <i>Helicobacter pylori</i>	23
20. Надмолекулярная организация инулина из <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus ficuum</i> и <i>Kluyveromyces marxianus</i> : сравнительный аспект.....	24
21. Наноцерий как основа для разработки специальных добавок и подложек для культивирования МСК человека	25
22. Технология получения липосом из соевого лецитина.....	26
Действие физико-химических факторов на биологические системы.....	27
23. Амилоидная и неамилоидная агрегация гладкомышечного тайтина	27
24. Влияние внешнего периодического поля на динамику кинков в плазмиде pTTQ18.....	28
25. Воздействие слабых комбинированных магнитных полей на культивируемые линии клеток человека.....	29
26. Исследование УФ-индуцированных изменений функциональных свойств трипсина, свободного и иммобилизованного на матрице кислоторастворимого хитозана.....	30
27. Исследование внутрисуточной динамики митотической активности у планарий <i>Schmidtea mediterranea</i> в различных условиях фоторежима.....	31
28. Исследование действия ускоренных ионов углерода на когнитивную деятельность у мышей <i>in vivo</i>	32
29. Клеточные реакции трех поколений потомков мышей, облученных ионизирующим и неионизирующим излучениями, <i>in vivo</i>	33
30. Количественный анализ трансрентальной ДНК у старых крыс после рентгеновского облучения и введения метформина.....	34
31. Обратимое и необратимое механическое повреждение ДНК λ -фага при электрораспылении.....	35
32. Увеличение пролиферативного потенциала фибробластов человека <i>in vitro</i> при действии ионизирующего излучения в малых дозах.....	36
33. Эффекты действия низкоинтенсивного светодиодного излучения различных длин волн на кровь и опухоль <i>in vitro</i>	37
Медицинская биофизика.....	38
34. Активация ксенобиотиков митохондриальной цитохром b5 редуктазой и ее белками-партнерами.....	38
35. Влияние пониженной экспрессии транслокаторного белка (TSPO knockdown) на PK11195 и PPIX модулированную индукцию mPTP в митохондриях, изолированных из клеток глиомы C6.....	39
36. Гипофракционированное облучение солидной карциномы Эрлиха у мышей на комплексе протонной терапии «Прометеус».....	40
37. Изучение антиоксидантных свойств структурно близких полифенолов.....	41
38. Изучение уровня активных форм кислорода в лимфоцитах человека при воздействии амилоидных фибрилл из лизоцима.....	42
39. Исследование стабильности биокатализатора на основе фицина, иммобилизованного на матрицах кислоторастворимого хитозана.....	43
40. Лекарственная устойчивость клеток острого миеломонобластного лейкоза, опосредованная гомотипической межклеточной адгезией.....	44
41. Модификация структурно-функциональных характеристик клеток	

селезенки мышей NMRI с асцитной карциномой Эрлиха в условиях фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода.....	45
42. Оценка эффективности материала «БИОГЛИСС» в качестве перспективного скаффолда для изготовления биопротезов клапанов сердца....	46
43. Эффекты паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на динамику регенерации кожи при химическом ожоге.....	47
Структура и динамика белков, нуклеиновых кислот и их комплексов.....	48
44. Анализ пространственной структуры двух диоксигеназ - деструкторов нефти.....	48
45. Картирование S100P-специфичного сайта интерлейкина-11.....	49
Нейродинамика и нейробиология.....	50
46. Регуляция функционального состояния мозга человека методом частотно-фазовой синхронизации сенсорных стимулов с нисходящей фазой потенциала альфа-ритма ЭЭГ человека в режиме реального времени.....	50
47. Non-muscle myosin dysfunction slows synaptic vesicle exocytosis rate at motor nerve endings	51
48. Влияние гипоксии на кальциевый гомеостаз клеток из различных отделов мозга <i>in vitro</i>	52
49. Изучение механизмов действия нейротоксиканта хлорида триметилолова на мозг крыс.....	53
50. Как формируется тета-ритм в гиппокампе. Вычислительная модель.....	54
51. Нарушение работы немышечного миозина замедляет процессы экзоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях.....	55
52. Нейрональная активность зависит от скорости протока инкубационной среды в экспериментах <i>in vitro</i>	56
53. Хроническое подавление гликолиза ведет к развитию гипервозбудимости в мозге экспериментальных животных.....	57
Новые методы в биофизических исследованиях.....	58
54. Разработка высокочувствительного и быстрого способа определения ДНК с помощью микрочипов.....	58
Биофизика супрамолекулярных систем.....	59
55. Изучение влияния полиэлектролитов на ферментативную активность алкогольдегидрогеназы, в связи с проблемой создания микродиагностикомов многократного использования.....	59
56. Разрушение оболочки и выход белка из микрокапсул, состоящих из небiodeградебельных полиэлектролитов.....	60
57. Создание биосенсорных диагностических пластин.....	61
Алфавитный указатель авторов по номерам тезисов.....	62

Биофизика клетки

1. Влияние бета-амилоидных пептидов на показатели энергетического обмена и концентрацию 2,3-дифосфоглицерата в разной популяции эритроцитов крыс

Тихонова Л.А.^{1,2*}, Косенко Е.А.^{1,2}, Каминский Ю.Г.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

* ljudasik09@rambler.ru

В настоящее время известно, что при болезни Альцгеймера (БА) в сосудах головного мозга происходит накопление бета-амилоидных пептидов (амилоидная ангиопатия), где они могут взаимодействовать и повреждать форменные элементы крови, в частности, эритроциты. Это подтверждается значительным накоплением свободного гемоглобина и продуктов его распада в мозге пациентов. Кроме того, одним из биохимических признаков, характеризующих БА, является снижение аэробного обмена глюкозы в мозге. Одной из причин этого может быть недостаточное поступление кислорода. Переносчиком кислорода в ткани и органы являются эритроциты, функциональное состояние которых играет огромную роль в регуляции сродства гемоглобина к кислороду. Механизм повреждения эритроцитов при контакте с амилоидными пептидами неизвестен. Популяция эритроцитов гетерогенна. Поскольку старые эритроциты в большей степени, чем молодые клетки, восприимчивы к эндогенным патологическим факторам, данная работа посвящена выявлению возможных механизмов старения эритроцитов под воздействием амилоидных пептидов. В работе исследовались показатели энергетического обмена в эритроцитах разного возраста, а также концентрация 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), который является одним из ключевых метаболитов, определяющих сродство гемоглобина к кислороду. Было показано, что под воздействием амилоидных пептидов происходит снижение активности ключевых гликолитических ферментов, снижение скорости потребления глюкозы и образования лактата, снижение концентрации АТФ, повышение концентрации АДФ и АМФ. Также наблюдается снижение содержания 2,3-ДФГ в обеих популяциях эритроцитов. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что под воздействием амилоидных пептидов происходит ускоренное старение эритроцитов, и было предположено, что одной из причин снижения аэробной утилизации глюкозы в мозге при БА может быть снижение концентрации 2,3-ДФГ из-за нарушения энергетического обмена.

2. Исследование влияния экзогенного кальция на структурно-функциональное состояние лимфоцитов человека

Хотина В.А.^{1*}, Гюппенен М.А.¹, Наквасина М.А.¹, Артюхов В.Г.¹

1. ФГБОУ ВО ВГУ;

* nafany905@gmail.com

Кальций является одним из важнейших регуляторов структурно-функционального состояния клеток: участвует в процессах мембранного транспорта, передачи информации в клетку, межклеточной коммуникации, клеточной гибели. С целью расширения представлений о роли внеклеточного кальция в регулировании структурно-функциональных свойств иммунных клеток с помощью методов флуоресценции, спектрофотометрии и проточной цитофлуориметрии исследовано его влияние на уровень активности ряда ключевых ферментов, метаболический индекс, структурное состояние плазматических мембран, процессы гибели лимфоцитов периферической крови человека.

Выявлено уменьшение величины метаболического индекса лимфоцитов человека до уровня $35,4 \pm 6,9$ и $42,8 \pm 5,6$ отн. ед. соответственно в «бескальциевой» среде и в среде с избытком кальция (13 ммоль/л) по сравнению с таковой (100%) для среды с нормальной концентрацией кальция ($1,3$ ммоль/л).

Обнаружено статистически достоверное снижение уровня каталитической активности лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глутатионредуктазы лимфоцитов и повышение величины активности плазматической Ca^{2+} -АТФазы в условиях дефицита и избытка внеклеточного кальция по отношению к контролю.

С помощью флуоресцентного зонда 1-анилино-нафталин-8-сульфоната показаны изменения поверхностных свойств лимфоцитов в «бескальциевой» среде и среде с избытком кальция по сравнению с клетками, инкубированными при нормальной концентрации кальция.

Обнаружено статистически достоверное снижение уровня жизнеспособности лимфоцитов, инкубированных в течение $1-4$ ч в «бескальциевой» среде и среде с избытком кальция, по отношению к таковому для клеток в присутствии кальция в нормальной концентрации.

С использованием метода проточной цитофлуориметрии установлено, что в «бескальциевой» среде и среде с избытком кальция через 2 ч инкубации осуществляются процессы гибели лимфоцитов — преимущественно апоптоз (по митохондриальному пути) и в меньшей степени некроз.

3. Исследование изменений функциональной активности каспазы–8 лимфоцитов человека в условиях воздействия УФ–света и пероксида водорода

Ефремова Д.С.^{1*}, Токмакова Е.В.¹, Наквасина М.А.¹, Артюхов В.Г.¹

1. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

* livingston_jo@mail.ru

В настоящее время одной из приоритетных проблем биофизики клетки является изучение молекулярных механизмов апоптотической гибели клеток в норме, при патологии, в условиях воздействия физико–химических факторов. Реализация апоптоза связана с функционированием особого семейства цистеиновых протеиназ — каспаз. Классической инициирующей каспазой при передаче сигналов от рецептора смерти Fas (CD95) является каспаза–8, которая активирует эффекторную каспазу–3.

С целью детализации представлений о взаимодействии различных сигнальных путей апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного воздействием УФ–света (240 — 390 нм) в дозе 1510 Дж/м² и пероксида водорода (10 мкмоль/л), исследованы изменения уровня активности каспазы–8 нативных и модифицированных клеток.

УФ–облучение иммуноцитов и последующая инкубация в течение 1 и 2 ч фотомодифицированных лимфоцитов не вызывали статистически достоверных изменений величины активности каспазы–8 по сравнению с таковой для интактных клеток. Через 3 ч после УФ–облучения клеток выявлено повышение на 55 % уровня активности каспазы–8 по сравнению с таковым для немодифицированных лимфоцитов (100 %). УФ–облучение и инкубация клеток в течение 4 ч индуцировали снижение на 20 % величины активности каспазы–8 по отношению к величине исследуемого параметра для интактных клеток.

Воздействие H₂O₂ (10 мкмоль/л) на лимфоциты вызывало статистически достоверное повышение уровня активности каспазы–8 на 25 % по отношению к контролю (100 %). Воздействие H₂O₂ на клетки и их инкубация в течение 1, 2 и 3 ч индуцировали уменьшение соответственно на 28, 12 и 19 % величины активности каспазы–8 по отношению к величине исследуемого показателя для нативных лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу представления об активации каспазного пути реализации апоптоза при действии на лимфоциты УФ–излучения (240 — 390 нм) в дозе 1510 Дж/м², H₂O₂ (10 мкмоль/л) с участием инициирующей каспазы–8.

4. Мутантный альфа-синуклеин вызывает митохондриальную дисфункцию и гибель нейронов

Федотова Е.И.^{1*}, Абрамов А.Ю.², Бережнов А.В.¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия;

2. Институт неврологии Университетского колледжа Лондона, Лондон, Великобритания;

* g_56@rambler.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является распространенным нейродегенеративным заболеванием, которое характеризуется постепенной потерей дофаминергических и, на поздних стадиях, не-дофаминергических нейронов, а также накоплением внутриклеточных включений, содержащих агрегаты альфа-синуклеина (а-син). Большинство случаев БП спорадические (>90%), но случаев БП 5-10% являются наследственными, вызванными мутациями в генах, кодирующих, альфа-синуклеин, паркин, PINK1, DJ-1, и LRRK2. Генетические и патологоанатомические данные позволяют сделать вывод, что характерным признаком как спорадических, так и наследственных форм БП является нарушенный фолдинг а-син.

С использованием методов флуоресцентного имиджинга мы пытались выявить особенности действия на клетки мозга распространенных мутантных форм мономеров а-син: A53T, A30P и E46K. Мы обнаружили, что мутантный а-син A53T (100-300 нМ), но не а-син дикого типа (WT) и не мутантные формы A30P и E46K, индуцирует медленную и прогрессирующую митохондриальную деполяризацию (на 13%) в первичных нейронах и астроцитах различных отделов мозга крысы. Та же концентрация A53T также индуцирует рост митохондриального NADH, что в сочетании с падением митохондриального потенциала свидетельствует об ингибировании комплекса I ЭТЦ. Подавление дыхания мономерами A53T индуцирует увеличение производства АФК митохондриями (MitoSox).

Наномолярные концентрация мономерного а-син (A53T), но не а-син дикого типа (WT), вызывают гибель нейронов, измеренную с помощью Hoechst33342 + Propidium Iodide.

Важно отметить, что предварительная активация эндогенной антиоксидантной системы с помощью активаторов Nrf2 обладала защитным эффектом против токсического действия мономеров A53T.

Таким образом, мономерный а-син (A53T) вызывает токсические эффекты на клетки мозга через ингибирование комплекса I ЭТЦ и активацию оверпродукции АФК. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение №. 14.616.21.0054).

5. Ожирение вызывает недостаточность функциональной экспрессии внутриклеточных рецепторов-каналов в белых адипоцитах мыши

Туровский Е.А.^{1*}, Дынник В.В.², Туровская М.В.¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

2. Институт Теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* egorturovsky@gmail.com

Генерация Ca²⁺-ответов большинством клеток невозбудимых тканей при активации метаботропных рецепторов происходит преимущественно за счет мобилизации кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) через рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R) и (или) рианодиновые рецепторы (RyR). В адипоцитах белой жировой ткани экспрессируются оба этих типа внутриклеточных рецепторов. В предыдущих наших работах было показано, что при ожирении и диабете 2-го типа имеет место устойчивая резистентность белых адипоцитов к стимуляции адренергических рецепторов и значительное снижение чувствительности к стимуляции М3-мускариновых холинергических рецепторов [Туровский и др., 2013]. В виду того, что большинство подтипов адренергических рецепторов, отвечающих за быструю мобилизацию Ca²⁺, связаны с фосфоинозитидным сигнальным каскадом и IP3R, а М3-холинорецепторы с RyR, то можно предположить, что нарушение Ca²⁺-сигнализации адипоцитов при ожирении связано с нарушениями в экспрессии этих рецепторов-каналов. С помощью методов флуоресцентной микроскопии и прижизненного кальциевого имиджинга, совмещенного с последующим иммуногистохимическим окрашиванием нам удалось показать, что в белых адипоцитах, полученных из мышей с индуцированным ожирением, IP3R и RyR слабо экспрессированы и практически не окрашиваются антителами. Добавление в среду культивирования низких концентраций длинноцепочечных ацилкарнитинов – пальмитоилкарнитина (0,3 мкМ) частично восстанавливает Ca²⁺-ответы на норадреналин и ацетилхолин в отдельных белых адипоцитах. В этих клетках появляются IP3- и RyR, которые распределены не диффузно (в сравнении с адипоцитами из здоровых мышей), а собираются в определенных областях клетки. Работа поддержана стипендией Президента РФ СП-1057.2015.4.

6. Оптический пинцет как инструмент исследования ядерных структур ооцитов мыши.

Сырчина М.С.^{1*}, Айбуш А.В.¹, Костров А.Н.¹, Залесский А.Д.^{1,2}, Осыченко А.А.¹, Серобян Г.А.¹, Надточенко В.А.^{1,2}

1. Институт химической физики РАН им. Н.Н. Семенов, Москва, Россия ;
2. Московский физико-технический институт (государственный университет);

* wrongclue@gmail.com

Ядро ооцитов мыши содержит структуры – ядрышкоподобные тельца. Они подобны ядрышкам соматических клеток, но данные по их биохимическому составу и гомогенности остаются противоречивыми. Известно, что в период созревания ооцита, изменяется пространственная конфигурация хроматина – у более зрелых ооцитов хроматин плотным кольцом смыкается вокруг ядрышкоподобного тельца.

В настоящей работе нами предложен метод, основанный на применении оптических лазерных ловушек для исследования ядрышкоподобных телец, окруженных хроматином в ооцитах мыши.

Анализ динамики движения (скорости и направления перемещения) ядрышкоподобного тельца в кариоплазме позволит оценить вязко-эластические свойства хроматина, а также установить характер взаимодействия между компонентами ядра и цитоскелетом ооцита мыши.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта №14.604.21.0058/идентификатор RFMEFI60414X0058

7. Состояние мезентеральных сосудов при ишемически-реперфузионном поражении тонкого кишечника крысы

Звягина А.И.^{1*}, Гордеева А.Е.^{1,2}, Новоселов В.И.^{1,2}

1. Пущинский естественно-научный институт;

2. Институт биофизики клетки;

* gordeeva1310@yandex.ru

Ишемия – патологический процесс, который развивается при нарушении притока оксигенированной крови в орган, что приводит к нарушению функционирования клеток. Восстановление кровотока в ишемизированной ткани является более мощным стимулом для развития патологических сдвигов. Реперфузия приводит к нарушению, как структуры, так и функционирования органа. Кровеносные сосуды первыми принимают на себя удар оксигенированной крови, поэтому было проведено исследование состояния мезентеральных сосудов при ишемически-реперфузионном (И-Р) поражении тонкого кишечника. Для достижения поставленной цели была использована модель полной окклюзии верхней мезентеральной артерии и вены тонкого кишечника. На данной модели, было изучено морфологическое и функциональное состояние мезентеральных сосудов при И-Р тонкого кишечника. Было показано, что после 60 - мин ишемии и 120 - мин происходит поражение стенки сосудов, отмечается гиперемия и отсутствие мышечного тонуса, происходит поражение и десквамация эндотелиоцитов. Поражение вен более сильное, чем артерий. Функциональное состояние мезентеральных сосудов характеризуется изменением метаболизма оксида азота (NO) в крови. При И-Р поражении концентрация NO увеличивает в 2,5 раза. Как было показано нами ранее, И-Р поражение тонкого кишечника сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), а усиленное производство NO в данных условиях неизбежно приводит к его реакции в супероксидрадикалом с образованием пероксинитрита, что в итоге приводит к поражению сосудистой стенки. В данной ситуации использование ферментов – антиоксидантов класса пероксиредоксинов должно снизить гиперпродукцию АФК и в итоге минимизировать поражение сосудистой стенки.

Таки образом, состояние мезентеральных сосудов при И-Р поражении тонкого кишечника характеризуется повреждением эндотелиальных клеток и утратой миогенного тонуса на фоне увеличения концентрации оксида азота в крови.

Теоретическая биофизика и биоинформатика

8. Анализ динамических характеристик ДНК для промоторов бактериофага T7

Орлов М.А.^{1*}, Рясик А.А.¹, Зыкова Е.А.¹, Ермак Т.В.², Сорокин А.А.¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

2. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

* orlovmikhailanat@gmail.com

Быстрый рост производительности методов секвенирования геномов делает необходимой разработку автоматизированных методов аннотации. Как правило, используемые для этого алгоритмы используют первичную структуру ДНК и демонстрируют высокую эффективность при поиске кодирующих, но не регуляторных участков генома (вследствие низкой специфичности, особенно в случае промоторов). В последнее время разрабатываются более перспективные методики, которые наряду с текстовыми используют физические характеристики ДНК, имеющие большое значение для процесса ДНК-белкового взаимодействия. При этом показано, что совместное использование различных по своей природе свойств заметно повышает эффективность алгоритма [1].

Для оценки возможности использования динамических свойств (наряду с широко используемыми равновесными и структурными) изучены профили динамических характеристик открытых состояний (ОС) ДНК [2] для промоторов бактериофага T7, описывающие динамику двойной спирали переменного нуклеотидного состава.

Для промоторов T7 рассчитаны профили ряда характеристик ОС ДНК: энергии активации, размера, полупериода затухания и длины пробега, а также скорости звука в ДНК. Проведено сравнение этих характеристик между собой, а также с широко используемыми равновесными физическими свойствами. Показано, что данные модели сводимы к двум свойствам ОС — энергии активации и размерам, наименее коррелирующими с другими характеристиками (как динамическими, так и равновесными). Установлено, что профили этих двух характеристик T7-специфичных промоторов имеют характерные паттерны в области, ответственной за связывание РНК-полимеразы.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-37-00303 мол_а.

Литература.

Wang H.Q., Benham C.J. Promoter prediction and annotation of microbial genomes based on DNA sequence and structural responses to superhelical stress // BMC Bioinformatics Vol. 7, 2006, pp. 248-262.

A.A. Grinevich, A.A. Ryasik, L.V. Yakushevich (2015) Trajectories of DNA bubbles // Chaos, Solitons & Fractals, 75, 62.

9. Ген *umjA* *E. coli* является матрицей для синтеза мРНК и аРНК, которые процессируются РНКазой Rng

Маркелова Н.Ю.^{1,2*}, Сухаричева Н.А.^{1,2}

1. Институт биофизики клетки РАН;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино;

* markelova.n.y@gmail.com

В последнее время, благодаря методам полногеномного скрининга, были накоплены данные, свидетельствующие об антисмысловой транскрипции для многих бактериальных генов. Однако среди нескольких тысяч аРНК функциональную роль удалось установить только для очень небольшого числа. Поэтому биологическое значение антисмысловой транскрипции всё ещё не до конца раскрыто.

Высокий уровень антисмысловой транскрипции был нами зафиксирован в участке между генами *umjA* и *sarA*. Она начинается с одного или нескольких промоторов, находящихся в конце гена *umjA*. С помощью обратной транскрипции и Northern-гибридизации было зарегистрировано наличие в клетках РНК, комплементарных 3'-концу *umjA*-мРНК. Роль белка *UmjA* пока не установлена. Однако данные рибосомного футпринтинга свидетельствуют об активной трансляции *umjA*-РНК в патогенном шт. *E. coli* ЕНЕС О157:Н7. Уровень *umjA*-мРНК у патогенного штамма оказался в 2 раза выше, чем у *E. coli* K12 MG 1655. Эта разница косвенно указывает на возможное участие этого белка в реализации или поддержании систем патогенности.

Очевидно, что обнаруженные аРНК могут влиять на стабильность *umjA*-мРНК. Поэтому были измерены уровни *umjA*-мРНК в клетках трансформированных плазмидой, продуцирующей аРНК и установлено, что их содержание в клетках увеличивается. Косвенно это свидетельствовало об образовании комплементарного дуплекса мРНК-аРНК. Такие дуплексы могут быть мишенями для особой РНКазы Rng, которая разрушает структурированные РНК с выступающим 3'-концом. Поэтому на следующем этапе было определено внутриклеточное содержание смыслового и антисмыслового продуктов в зависимости от наличия в клетках РНКазы Rng. Оказалось, что делеция гена *rng* приводит к увеличению, как смыслового, так и антисмыслового продуктов гена *umjA* в 1,6 и 2,6 раз соответственно. Это подтверждает возможность формирования их комплементарного дуплекса, свидетельствует о позитивном влиянии *umjA*-аРНК на стабильность мРНК и указывает на возможное участие Rng в их процессинге.

10. Интерфейс мозг-компьютер замкнутого типа для управления инвалидным креслом

Лазуренко Д.М.*

1. НИИ нейрокибернетики им. А.Б. Когана Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия;

* mityasky@ya.ru

Интерес к поиску специфических электрографических паттернов мозга человека, связанных с произвольными движениями, возник в связи с разработкой нейроинтерфейсов (Интерфейс мозг-компьютер – ИМК). Такие системы ориентированы на создание принципиально нового мышечного канала управления для пациентов, обездвиженных по разным причинам.

Настоящая работа направлена на тестирование ИМК, утилизирующего высокочастотную (гамма-) активность мозга человека, сопряжённую с мысленным представлением движений, для управления креслом в реальном времени.

В исследовании участвовали 5 практически здоровых обследуемых, средний возраст которых составил 27,4 года. Замкнутый цикл нейрообратной связи реализован посредством усилителя биопотенциалов, программного обеспечения Krinc-BCI, выполняющего анализ сигналов мозга, их интерпретацию и трансляцию команд в инвалидное кресло. Регистрация электроэнцефалограммы от 8 отведений осуществлялась с помощью усилителя биопотенциалов «Энцефалан-131» (Медиком-МТД).

Задача обследуемых состояла в перемещении по заданной квадратной траектории: по часовой и против часовой стрелки. Результат управления инвалидным креслом в серии из 11 экспериментов показал, что точность распознавания 4 мысленных команд варьировала в диапазоне 40-82%. Движение по часовой стрелке (повороты направо), как правило, оказывалось более эффективным с точки зрения точности распознавания, тогда как при поворотах налево с вероятностью 23% детектировалась ошибка. Среднее отклонение от траектории движения кресла для заданного периметра (20 метров) составило 21% его длины. У 2 обследуемых (из 5) наибольшая точность управления достигалась на гамма-2-частотах, снижаясь при использовании гамма-1-частот. У 3 обследуемых наблюдалась обратная зависимость.

Таким образом, показано, что обследуемые, не имеющие существенного предобучения, способны эффективно управлять креслом для инвалидов, произвольно регулируя спектральную мощность высоких частот фронтальных, центральных и теменных областей мозга.

11. К вопросу о несинонимичности синонимических замен

Крутинина Е.А.¹, Крутинин Г.Г.¹, Камзолова С.Г.¹, Осипов А.А.^{1,2*}

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

2. Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;

* aosypov@gmail.com

Данный вопрос давно известен на примере предпочтительных кодонов и тРНК. Мы предлагаем принципиально новый подход на основе свойств ДНК, обеспечивающих ее многофункциональность.

Физ. св-ва геномной ДНК влияют на взаимодействие с белками, особ. регулирующими транскрипцию. ДНК сильно заряжена и электростатика имеет большое значение, также как и другие физ.св-ва, основанные на нуклеотидном составе, такие как кривизна, изгибаемость и термостабильность. Ранее мы показали наличие общих свойств электростатических профилей вокруг сайтов связывания транскрипционных факторов, промоторов и сайтов начала транскрипции в целом. Все они обладают увеличенным электростатическим потенциалом, который способствует нахождению сайтов и связыванию белков-регуляторов транскрипции - транскрипционных факторов и РНК-полимеразы. Результирующий профиль вокруг сайтов старта транскрипции имеет общую архитектуру среди всех прокариотической таксонов с вариациями в определенных пропорциях между ее элементами.

Особенности электростатического профиля, обнаруживая общие черты в областях регуляции транскрипции, захватывают начало области кодирования и поэтому точный состав нуклеотидов, необходимый для поддержки этого (и некоторых других) физических свойств интерферируют с программой кодирования белка. Это может проявляться в виде преобладания конкретных кодонов среди имеющихся синонимических или даже предпочтения синонимичных аминокислот, тем самым обеспечивая несинонимичность синонимичных замен под действием естественного отбора.

Также необходимо обеспечивать и консенсус последовательности сайтов связывания транскрипционных факторов, которые часто находятся в кодирующей области, особенно в ее начале и конце.

Несинонимичность синонимичных замен может привести к неправильным оценкам судьбы последовательностей, в том числе ошибкам молекулярных часов и ошибочным оценкам специфических мутаций биомедицинской важности.

Для проведения анализа использовалась DEPPDB.

Гранты: РФФИ 14-44-03683 и 16-04-01865

12. О проблемах экологического моделирования в контексте решения парадокса биоразнообразия

Калмыков Л.В.*

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* lev.kalmykov@gmail.com

Для теоретической экологии парадокс биоразнообразия долгое время являлся неразрешимой загадкой. Он возник как противоречие между принципом конкурентного исключения и видовым разнообразием в природе. Существуют две конкурирующие экологические теории, которые пытались решить эту проблему: теория ниши и теория нейтральности. Проблема в том, что обе эти теории основаны на непрозрачных математических моделях, которые игнорируют локальные взаимодействия между индивидами и не способны дать понимание механизмов межвидовой конкуренции. Математические модели сложных систем могут быть трех основных типов: черный ящик, серый ящик и белый ящик. Модели типа черный ящик немеханистические. Они не могут помочь создать механистическую экологическую теорию, так как они не дают прямого понимания индивидуально-ориентированных механизмов. Здесь мы делаем несколько критических замечаний по поводу недавних попыток решить этот парадокс с помощью модельных подходов типа «черный» и «серый ящик». Мы критически обсуждаем вклад нейтральной теории и попытки решить парадокс методами классической квантовой механики. Эти попытки являются скорее неэффективными из-за отсутствия механистичности и скорее запутывают, чем проясняют понимание механизмов биоразнообразия. Мы также обсуждаем наши результаты по моделированию механизмов конкурентного сосуществования и по решению парадокса биоразнообразия путем проверки принципа конкурентного исключения на математических моделях типа «белый ящик» [1].

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-31-00516 мол_а).

[1] Kalmykov V.L., Kalmykov L.V. On ecological modelling problems in the context of resolving the biodiversity paradox // Ecological Modelling. 2016. Т. 329. — С. 1-4.

13. Предсказания промоторов *e.coli* с помощью динамических характеристик открытых состояний днк методами машинного обучения

Рясик А.А.^{1*}, Орлов М.А.¹, Зыкова Е.А.¹, Ермак Т.В.², Сорокин А.А.¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

2. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия;

* arc7an@gmail.com

Развитие методов секвенирования привело к ситуации когда скорость секвенирования геномов значительно превышает скорость их аннотации. Классическим подходом к аннотации в биоинформатике является работа с текстовыми последовательностями ДНК. Несмотря на все успехи в этой области, данный метод не позволяет с достаточной специфичностью предсказывать положение регуляторных последовательностей ДНК. Особенно явно это проявляется при решении задачи поиска промоторов в слабо-охарактеризованных геномах.

Мы предлагаем использовать при поиске промоторов физические характеристики молекулы ДНК в окрестности точки старта транскрипции. Известно, что после узнавания промотора РНК-полимеразой происходит образование открытых состояний ДНК (ОС). Мы предполагаем, что промоторные участки возможно обладают повышенной склонностью к образованию ОС, либо к образованию более долгоживущих ОС. Поэтому, мы сравнили особенности распределения в промоторных и непромоторных областях таких характеристик ОС, как энергия активации, линейный размер, полупериод затухания и длину пробега, а также локальную скорость звука в ДНК. Было показано, что среди выбранных характеристик только энергия активации и размер ОС являются независимыми, поэтому в дальнейшем анализе были использованы только эти два профиля.

Для классификационного анализа были подготовлены пять наборов фрагментов ДНК: 699 экспериментально подтвержденных промоторов *E.Coli*, гены *E.Coli*, lowscore-последовательности, промоторные островки и участки ДНК, находящиеся на расстоянии не менее 300 п.о. от известных промоторов (непромоторы). С помощью методов Naïve Bayes и Random Forest были построены 8 классификаторов, обученных различать промоторы и непромоторные участки различного типа. Анализ результатов обучения показал, что модели показывают одинаковые параметры точности, специфичности и чувствительности для всех групп — 100%, кроме модели “промоторы против непромоторов”.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-37-00303 мол_а.

14. Роль электростатики в регуляции транскрипции прокариот. Новый древний фактор естественного отбора в геноме

Осипов А.А.^{1*}

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* aosypov@gmail.com

ДНК сильно заряжена, и электростатика играет важную роль в ее взаимодействии с белками. Нами разработана DEPPDB - база данных электростатических и других физических свойств всех полных секвенированных геномов.

Отрицательный ЭП имеет неоднородное распределение вдоль молекулы ДНК и прямо, но не однозначно, зависит от ее GC состава. Частота связывания молекулы РНК-полимеразы вдоль генома коррелирует со значением ЭП.

Области регуляции транскрипции имеют выраженные особенности ЭП. Сайты связывания транскрипционных факторов расположены в протяженных областях повышенного ЭП и сами имеют высокое его значение. Промоторы в среднем имеют повышенное значение величины и неоднородности профиля ЭП. Точки старта транскрипции прокариотических геномов характеризуются протяженной (сотни п.о.) зоной повышенного ЭП и серией неоднородностей вокруг ТСТ. Это связано с посадкой белков и формированием других физических свойств, необходимых для работы машины транскрипции. Конкретные детали этой архитектуры схожи у близких таксонов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что третий промоторный детерминант — *ur*-элемент — имеет электростатическую природу. Rho-независимые терминаторы транскрипции находятся в области повышенного потенциала.

Другие физические свойства ДНК могут взаимодействовать с электростатикой как при своем формировании, так и при регуляции работы генома.

Т.о. Э играет важную и универсальную роль в регуляции транскрипции. Предлагаемый механизм влияет на вероятность связывания и точность позиционирования белков. Универсальный характер регуляторного воздействия Э позволяет предположить его важность для процесса горизонтального переноса генов и эволюции систем регуляции транскрипции и внести вклад в понимание проблемы повышенного содержания АТ в регуляторных областях генома.

Формирование физических свойств позволяет по-новому взглянуть на фундаментальные проблемы второго правила Чаргаффа, избыточности генетического кода, нейтральности синонимических замен и др.

Гранты: РФФИ 14-44-03683 и 16-04-01865

15. Транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии в статоцистах *Helix lucorum* в условиях микрогравитации

Осипов А.А.^{1,2*}, Асеев Н.А.¹, Чеснокова Е.А.¹, Рощин М.В.¹, Колосов П.М.¹, Балабан П.М.¹

1. Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;

2. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* aosypov@gmail.com

Виноградная улитка *Helix lucorum* является классическим модельным объектом для исследования функций нервной системы. Для того, чтобы понять геномные механизмы рецепции силы тяжести, мы провели транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии в статоцистах *Helix lucorum* в условиях микрогравитации космического полета.

8 животных объединили в две равные группы - летавшие в космос ($n = 4$) и контроль на Земле ($n = 4$), в каждом образце для анализа транскриптома было использовано 13 клеток. Мы провели сборку полного транскриптома *de novo* общей мРНК, секвенированной с помощью системы Ion Proton. Около 60% чтений на образец картировались на сборку, обеспечив более 40 генов со значительной дифференциальной экспрессией (а именно подавленной в условиях космического полета). Большинство из них относятся к клеточной рецепции и различным стадиям внутриклеточной сигнализации, в том числе к путям регуляции экспрессии генов. Следует отметить, что картирование на сборку транскриптома нервной системы целиком, предоставленную нашими коллегами, показало на 20% меньшее покрытие и не выявило значительной дифференциальной экспрессии.

Полученные данные показывают, что гены, слабее экспрессирующиеся в условиях микрогравитации, являются специфическими для статоцистов и, вероятно, связаны с рецепцией силы тяжести.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-25-00072.

Биофизика одиночных молекул. Нанобиотехнологии

16. Анализ влияния полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных цитрат-стабилизированными наночастицами $Ce_{1-x}Gd_xO_2-x$, на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro*.

Попов А.Л.¹, Попова Н.Р.^{1*}, Селезнева И.И.¹, Иванов В.К.²

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова;

* nellipopovaran@gmail.com

Современный уровень развития нанотехнологий позволяет синтезировать новые полифункциональные наноматериалы, обладающие уникальными физико-химическими свойствами, которые находят широкое применение в биомедицинских приложениях. Ранее показано, что одним из наиболее перспективных материалов для биомедицинских целей является нанокристаллический диоксида церия (НДЦ). Его уникальные редокс-свойства, обусловленные высокой степенью кислородной нестехиометрии поверхности, определяют его активность в биологических системах. Существует несколько способов повысить кислородную нестехиометрию НДЦ, например путем допирования их кристаллической решетки редкоземельными металлами. Ранее была показана возможность допирования НДЦ ионами гадолиния (Гиль, 2012). Увеличение активности поверхности НДЦ ограничивает возможность их эффективной внутриклеточной доставки. В связи с этим методом нами был предложен интегрировать НДЦ в структуру полиэлектролитной микрокапсулы. Методом Ibl нами были синтезированы полиэлектролитные микрокапсулы, в которые были интегрированы цитрат-стабилизированные НДЦ $Ce_{1-x}Gd_xO_2-x$.

Проведенный анализ цитотоксичности синтезированных микрокапсул методом МТТ-теста через 24 часа культивирования показал отсутствие их цитотоксического действия в концентрациях 1, 5, 10 и 50 микрокапсул на клетку, при этом концентрация 100 капсул на клетку незначительно снижала сигнал МТТ. Анализ жизнеспособности клеточной культуры МСК человека с использованием селективных флуоресцентных красителей (Syto9/PI) через 24 часа культивирования не показал достоверных различий с контрольной группой клеток во всех исследованных концентрациях. Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные микрокапсулы являются нетоксичными для МСК человека и могут быть использованы как безопасная система доставки НДЦ в клетку.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 16-34-60248.

17. Исследование *in vitro* цитотоксичности и адгезионных свойств нанопаст на основе кальций-фосфатных соединений, предназначенных для реконструктивной хирургии костной ткани

Фадеев Р.С.^{1,2}, Минайчев В.В.^{1,2*}, Фадеева И.С.^{1,2}, Кирсанова П.О.¹, Звягина А.И.^{1,2}, Просвирина А.А.⁴, Фесенко Н.И.², Телешев А.Т.³, Акатов В.С.^{1,2}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;
3. Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия;
4. Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия;

* vminaychev@gmail.com

Среди особо востребованных остеопластических материалов можно выделить нанопасты (НП) на основе различных кальций-фосфатных соединений (КФС), важным свойством которых является их обводнённость, способствующая малоинвазивному введению и обеспечивающая протекание естественной минерализации КТ в области дефекта.

Целью исследования является разработка НП на основе КФС, предназначенных для аугментации КТ в условиях малоинвазивного хирургического вмешательства. Первичной задачей являлось выявление возможного цитотоксического эффекта НП, их влияние на адгезию, распластывание и митотическую активность клеток *in vitro*. Объектом исследования служил экспериментальный образец НП ГАП-2(1). В качестве валидированного образца сравнения использовалась коммерческая НП ReproBone novo (Ceramisys, Англия).

В результате морфологического анализа адгезии и распластывания установлено, что на поверхности НП ГАП-2(1) и ReproBone novo происходит адгезия клеток, однако не происходит их полноценное распластывание. Исследование цитотоксичности показало отсутствие достоверного изменения числа погибших клеток при культивировании на данных образцах, по сравнению с культивированием на культуральной посуде. Митотическая активность клеток, культивированных на образцах НП, отсутствовала. Полученные данные показывают, что клетки на поверхности НП неспособны к делению и пролиферации.

Т. о., исследованные НП ГАП-2(1) и ReproBone novo не обладают цитотоксичностью, обеспечивают адгезию, но ингибируют распластывание клеток на их поверхности, что препятствует нормальной жизнедеятельности клеток, и является причиной отсутствия клеточной пролиферации на самом материале.

Несмотря на полученные *in vitro* данные остаётся открытым вопрос о биосовместимости и остеокондукции НП при имплантации биообъектам, а также выявлении и насыщении данных паст различными остеоиндуктивными активностями, способствующими физиологической аугментации КТ в области дефекта, что является дальнейшим этапом в цикле предстоящих исследований.

18. Квантово-химический конформационный и термодинамический анализ структур 20 протеиногенных L-аминокислот и их кремниевых аналогов

Щербаков К.А.^{1*}, Кондратьев М.С.²

1. Марийский Государственный Университет, Йошкар-Ола, Россия;

2. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* Kirill.Soff@gmail.com

При разработке теорий, описывающих альтернативные формы жизни, особо место уделяется кремнию, как элементу, способному заменить углерод в аналогах сложных биологических соединений. Связать это можно с тем, что кремний и углерод имеют схожее строение валентных электронных оболочек их атомов. Исходя из этого, можно предположить, что кремний способен служить основой для формирования сложных, разветвлённых молекул.

В связи с этим особый интерес представляет изучение кремниевых аналогов известных биомолекул. Объектом исследования послужили кремниевые аналоги 20 протеиногенных аминокислот. Целью исследования являлся поиск наиболее стабильных конформеров этих соединений. При помощи пакета MORAS6 и полуэмперической параметризации PM3 нам удалось получить оптимизированные структуры 20 протеиногенных аминокислот и их кремниевых аналогов. Для соединений кремния метод PM3 показал недостаточную приемлемость: некоторые валентные углы при оптимизации становились острыми. По этой причине найденные минимумы были пересчитаны в пакете MORAS 2012 с использованием параметризации PM7.

Проведенный ранее анализ энергетических минимумов углеродных и кремниевых аминокислот, рассчитанных в PM3, показал, что большинство кремниевых аминокислот характеризуются более выраженной термодинамической стабильностью. Использование параметризации PM7 продемонстрировало, что отрицательные экстремумы теплот образования кремниевых аминокислот оказались более выраженными, чем эти же величины для углеродных. Оптимизация структур кремниевых аминокислот с использованием PM7, позволила получить для них более реалистичную геометрию, по этой причине параметризация PM7 представляется более предпочтительной для этого класса соединений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект №16-33-50101 мол_нр)

19. Конструирование потенциальных биосенсоров на основе бактерии *Helicobacter pylori*.

Белова А.М.^{1*}, Басманов Д.В.¹, Клинов Д.В.¹, Лазарев В.Н.¹

1. ФБГУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России;

* ambelova26@gmail.com

Helicobacter pylori – спиралевидная, грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, которая инфицирует различные области желудка и двенадцатиперстной кишки. Показано, что бактерия может вызывать гастрит, а также язву желудка и рак кишечника.

Целью работы было конструирование репортерных систем на основе бактерии *H. pylori* для последующего получения потенциальных биологических сенсоров.

Для осуществления поставленной задачи были получены рекомбинантные векторы, в составе которых под контролем промоторных областей различных генов *H. pylori* находился ген, кодирующий Зеленый флуоресцентный белок (GFP), флуоресценция которого может быть зарегистрирована в отдельных живых клетках и количественно оценена.

Среди трансформированных штаммов *H. pylori*, содержащих полученные плазмиды, было выбрано несколько вариантов, содержащих промоторные области наиболее важных генов, для оценки чувствительности потенциальных репортерных систем к внешним воздействиям.

Анализ проводился различными экспериментальными методами. В частности, с помощью Real Time PCR была проведена оценка уровней экспрессии гена *gfp*, в случае действия на трансформанты различных индукторов, выбранных в зависимости от соответствующей промоторной области.

Однако наиболее интересным и перспективным методом, является оценка именно единичной клетки. Для этого были подобраны условия и проведена иммобилизация клеток *H. pylori* на микрофлюидной платформе с целью исследования изменения интенсивности флуоресценции GFP отдельных клеток маркерных штаммов *H. pylori* в ответ на изменение pH и температуры среды для культивирования, а также добавление к среде индуктора.

20. Надмолекулярная организация инулиназ из *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus*: сравнительный аспект

Холявка М.Г.^{1*}, Макин С.М.¹, Кондратьев М.С.², Абдуллатыпов А.В.³, Артюхов В.Г.¹

1. Воронежский государственный университет;
2. Институт биофизики клетки РАН;
3. Институт фундаментальных проблем биологии РАН;

* holyavka@rambler.ru

Инулиназы участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, гидролизуя инулин и фруктоолигосахариды до фруктозы.

Существуют экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7). Эндоинулиназы расщепляют молекулу инулина до олигосахаридов вдали от концевых остатков фруктозы. Экзоинулиназы отщепляют концевые остатки фруктозы от молекул инулина и сахарозы.

Для понимания механизма действия инулиназ *in vivo* необходимо исследовать особенности их надмолекулярной организации, поэтому целью работы было создать компьютерные модели димеров инулиназы из грибных и дрожжевого продуцентов, выявив типы контактов между мономерами экзо- и эндо-форм фермента.

В качестве объектов исследования выступали экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W), эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) и экзоинулиназа из *Kluyveromyces marxianus*, которая была получена путем реконструкции на основе структуры молекулы инвертазы из *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-ID: 4EQV) [1].

Моделирование белковых комплексов осуществляли в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock [2].

Установлено, что экзоинулиназа из *A. awamori* и эндоинулиназа из *A. ficuum* имеют более схожие первичные структуры, однако, механизм формирования димеров у них отличается в большей степени, по сравнению с двумя экзоинулиназами.

Из расчетов следует, что количество неполярных и полярных незаряженных аминокислотных остатков, которые встречаются в составе контактных площадок при формировании димера инулиназы, значительно выше, чем количество остатков, заряженных отрицательно и положительно. В процессе димеризации инулиназы ключевая роль, вероятно, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, что хорошо согласуется с результатами ИК-спектроскопии, изложенными в работе [3].

1. Abdullatypov A.V. et al. (2016) Biophysics, 61 (4), 565–571.
2. Holyavka M.G. et al. (2015) Biophysics, 60 (4), 522–528.
3. Artyukhov V.G. et al. (2009) Biophysics, 54 (6), 675–680.

21. Наноцерий как основа для разработки специальных добавок и подложек для культивирования МСК человека

Попов А.Л.^{1*}, Попова Н.Р.¹, Селезнева И.И.¹, Иванов В.К.²

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова;

* toshka_bf@mail.ru

Нанокристаллический диоксид церия (НДЦ) является ярким примером нанобиоматериала нового поколения. Низкая токсичность, высокая степень биосовместимости и уникальные редокс-свойства НДЦ делают его одним из наиболее перспективных материалов биомедицинского назначения.

Клеточная терапия все больше находит свое широкое применение при лечении социально-значимых заболеваний. Перевод клеток в культуру, манипуляции при пересеве, а также обработка протеолитическими ферментами, приводят к развитию состояния перманентного окислительного стресса в клетке, что ограничивает скорость их пролиферации. Медленная скорость пролиферации клеток в культуре увеличивает сроки ожидания необходимой терапии.

На культуре мезенхимальных стволовых клеток человека, выделенных из пульпы зуба, показано, что предварительное внесение в культуру клеток НДЦ стимулирует их пролиферацию в дозо-зависимой манере. Процесс стимуляции пролиферации связан со снижением уровня внутриклеточных АФК и модуляцией генов пролиферации, стволовости и миграции. Полученные нами данные о влиянии нанокристаллического диоксида церия на морфо-функциональные характеристики и пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток позволяют говорить о перспективности использования НДЦ как основы для создания эффективных и недорогих культуральных саплиментов и подложек для культивирования клеток *in vitro*.

22. Технология получения липосом из соевого лецитина

Шилова Е.В.^{1*}, Колтаков И.А.¹, Артюхов В.Г.¹

1. ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

* zinkovae@list.ru

Проблема доставки лекарственных препаратов до мишени их действия на сегодняшний день стоит наиболее остро. Максимальному эффекту действия различных биологически активных веществ препятствует неравномерность их распределения в организме. Использование липосомальных наноконтейнеров даёт возможность регулирования распределения, высвобождения в организме лекарственных препаратов. Необходимыми условиями для использования в терапии липосом являются малые размеры получаемых частиц и достаточное количество лекарственного препарата, включаемое в их состав.

Целью данной работы явилась разработка способа получения липосомальных частиц из соевого лецитина, соответствующих требованиям.

Липосомы получали методом гидратации/регидратации. Раствор соевого лецитина (Sigma) в этиловом спирте испаряли в роторном испарителе ИКА RV10. Затем добавляли 0,01М натрий-фосфатный буфер (pH=7,4). Полученные растворы были подвергнуты облучению на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Q500 в течение 15 минут.

Для получения однослойных липосом суспензию подвергали продавливанию через мембранные фильтры с размером пор 100нм. В работе использовали липосомальный экструдер LP-50, LipoFast.

Размер полученных липосом измеряли с помощью спектрометра динамического светорассеяния Photocor-FC. Данные, полученные с использованием этого метода, показывают, что при этом образуется монодисперсная система.

В ходе проведения исследований было установлено, что продавливание липосомальных везикул через экструдер позволяет получать биосовместимые наночастицы с размерами $59,95 \text{ нм} \pm 1,49 \%$. Однако подобранные нами условия УЗ-гомогенизации липосом без использования липосоматоров позволяют существенным образом снизить затраты на их производство. Полученные с помощью описанного нами метода моноламеллярные везикулы имеют размер $106,2 \text{ нм} \pm 4,8\%$, что делает их более пригодными для инкапсуляции различных лекарственных препаратов.

Действие физико-химических факторов на биологические системы

23. Амилоидная и неамилоидная агрегация гладкомышечного тайтина

Якупова Э.И.^{1,2*}, Вихлянцев И.М.¹, Бобылёв А.Г.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

* yakupova.mira@mail.ru

Исследованы *in vitro* агрегационные свойства гладкомышечного тайтина. Обнаружено, что в растворах с ионной силой близкой к физиологической тайтин гладких мышц желудочка курицы формирует два типа аморфных агрегатов: амилоидные (АА) и неамилоидные (НА), что было подтверждено с помощью спектральных методов анализа. Методом динамического светорассеяния показано, что через 180 минут инкубации в образцах с НА наблюдалось присутствие трех фракций частиц с гидродинамическими радиусами: $R_h \sim 20$ нм, $R_h \sim 200$ нм, $R_h \sim 8000$ нм. В случае с АА наблюдалось присутствие трёх фракций частиц, гидродинамические радиусы которых составили: $R_h \sim 20$ нм, $R_h \sim 700$ нм и $R_h \sim 8000$ нм. Не было обнаружено различий в скорости агрегирования тайтина, а также процентном содержании фракций частиц для обоих типов агрегатов. Однако обнаружены различия между АА и НА тайтина в способности реагрегировать при повышении ионной силы (до 0.6 М КСl). В частности, в образцах НА этого белка наблюдалось присутствие частиц с $R_h \sim 12$ нм, что может свидетельствовать о реагрегации тайтина до отдельных его молекул. В образцах АА тайтина частиц с подобным гидродинамическим радиусом не наблюдалось, что указывает на необратимость амилоидной агрегации этого белка.

Данные атомно-силовой микроскопии показали, что НА формировали структуру высотой 8-10 нм подобную губке. После реагрегации они формировали более рыхлую структуру, состоящую из протофибрилл или сферических агрегатов с высотой 10-12 нм. АА по данным атомно-силовой микроскопии были представлены в виде ветвящихся цепочек, состоящих из сферических агрегатов диаметром около 300-500 нм и высотой до 35 нм. Повышение ионной силы приводило к появлению более крупных сферических агрегатов, достигающих в диаметре 2 мкм и 400 нм в высоту. Таким образом, впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что один и тот же белок формирует *in vitro* два типа агрегатов: амилоидные и неамилоидные.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00283.

24. Влияние внешнего периодического поля на динамику кинков в плазмиде pTTQ18

Балашова В.Н.^{1*}, Закирьянов Ф.К.¹, Якушевич Л.В.²

1. Башкирский государственный университет, Уфа, Россия;

2. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* Felizija2010@mail.ru

В связи с постоянным увеличением количества различных устройств в технологической и бытовой сферах жизнедеятельности человека возросла актуальность вопроса о влиянии постоянных и переменных физических полей на живые организмы. В данной работе рассматривается задача, связанная с этим направлением: мы исследуем влияние переменного поля на движение «открытого состояния» молекулы ДНК.

Молекулу ДНК можно рассматривать как сложную физическую систему, состоящую из большого числа определенным образом расположенных в пространстве атомов и атомных групп (двойная спираль) и связанных друг с другом разнообразными (сильными и слабыми) связями (ковалентные связи, водородные связи, стэкинг-взаимодействия и т.д.).

Такая система не статична и обладает внутренней подвижностью, обусловленной воздействием температуры, столкновением с молекулами раствора, взаимодействием с белками и т.д.

В нашей работе мы рассматривали только угловые колебания оснований вокруг сахаро-фосфатных цепочек, поскольку именно они вносят существенный вклад в раскрытие пар оснований и расплетание двойной спирали, т.е. в процесс образования «открытого состояния».

Для математического описания вращательной динамики ДНК мы использовали модель Инглэндера [1], дополненную слагаемыми, имитирующими эффекты диссипации и действие периодического внешнего поля [2]. Одно из решений модельного уравнения, имеющее форму кинка интерпретировалось как математический образ открытого состояния молекулы ДНК.

Используя аналитические методы и методы компьютерного моделирования, нами были получены и проанализированы временные зависимости скорости, координаты, размера и энергии кинка в последовательности pTTQ18 при разных значениях параметров внешнего периодического воздействия. Показано, что изменяя эти параметры, включая и выключая внешнее воздействие, можно регулировать скорость и направление движения кинка.

25. Воздействие слабых комбинированных магнитных полей на культивируемые линии клеток человека.

Знобищева А.В.^{1*}, Ермаков А.М.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* anna.znob@gmail.com

Ранее в лаборатории В.В. Леднева было показано, что слабые комбинированные магнитные поля (КМП) в режиме параметрического резонанса в зависимости от настройки на различные ионы, в отличие высокоамплитудных магнитных полей, могут достаточно воспроизводимо влиять на рост и развитие различных биологических объектов. Между тем исследований влияния этих режимов КМП на уровне культивируемых клеток не проводилось. Целью данной работы являлось исследование воздействия слабых комбинированных магнитных полей на культивируемые стволовые и трансформированные клетки человека.

В эксперименте использовали культуры первичных мезенхимальных стволовых и трансформированных клеток линии MNNG/hos. Клетки в 96 луночных планшетах экспонировали в термостатируемых камерах в фокусе переменного магнитного поля, создаваемого генератором и катушками Гельмгольца. Амплитуду и частоту переменного магнитного поля настраивали в соответствии с теорией В.В. Леднева. Эффекты воздействия магнитных полей оценивали по изменению скорости роста культур, жизнеспособности клеток, экспрессии генов и способности клеток к дифференцировке по росту кальцификатов. Полученные данные усреднялись по результатам трех экспериментов.

Анализ скорости роста клеточных культур, экспонировавшихся в комбинированном магнитном поле, настроенном на ионы кальция, калия или спины атомов водорода не выявил существенных изменений этого параметра, также как и жизнеспособности клеток. Напротив, нами обнаружено изменение скорости образования кальцификатов и их размера при воздействии КМП. В культивируемых стволовых и трансформированных клетках человека обнаружено изменение уровня экспрессии генов, ответственных за пролиферацию, дифференцировку и гибель.

Таким образом, нами показана способность слабых комбинированных магнитных полей, настроенных в режиме магнитного параметрического резонанса модулировать уровень экспрессии генов и дифференцировку культур стволовых и трансформированных клеток человека.

26. Исследование УФ-индуцированных изменений функциональных свойств трипсина, свободного и иммобилизованного на матрице кислоторастворимого хитозана

Сазыкина С.М.^{1*}, Холявка М.Г.¹, Королева В.А.¹, Ольшанникова С.С.¹, Артюхов В.А.¹

1. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

* sazykina.93@mail.ru

Исследования в области разработки высокостабильных гетерогенных препаратов на основе иммобилизованных ферментов приобретают все большую популярность. Для иммобилизованных ферментов число возможных инактивирующих агентов (таких как УФ-излучение, температура) существенно меньше, чем в случае растворимых белков. Важнейший результат воздействия УФ-излучения на белки – их инактивация и денатурация. Несмотря на обширные фотохимические и фотобиологические исследования, остаются невыясненными многие вопросы биологического действия УФ-радиации на живые организмы, поэтому работы, направленные на изучение УФ-индуцированных изменений функциональных характеристик ферментов, остаются актуальными. Целью работы было изучение воздействия УФ-излучения на процессы фотоинактивации свободного и иммобилизованного трипсина.

Иммобилизацию трипсина на матрице хитозана осуществляли методом адсорбции [1]. Количество белка определяли методом Лоури. УФ-облучение образцов проводили при их перемешивании магнитной мешалкой в термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм.

Установлено, что при облучении свободного трипсина в дозах 151 и 453 Дж/м² наблюдается тенденция к увеличению его активности, начиная с дозы 1510 Дж/м² происходит незначительное снижение его каталитической способности, которое становится статистически значимым при 3020, 4530, 6040 Дж/м². При облучении иммобилизованного препарата в дозе 453 Дж/м² наблюдается тенденция к увеличению активности фермента, при дозах 3020 и 4530 Дж/м² его каталитическая способность начинает снижаться, изменения приобретают статистически значимый характер при 6040 Дж/м². Таким образом, иммобилизованный на матрице хитозана трипсин более стабилен к действию УФ-света по сравнению со свободным ферментом.

1. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. (2015) Биофармацевтический журнал, 2, 13–16.

27. Исследование внутрисуточной динамики митотической активности у планарий *Schmidtea mediterranea* в различных условиях фоторежима

Скавуляк А.Н.², Ермаков А.М.^{1*}, Крещенко Н.Д.²

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* ao_ermakovy@rambler.ru

Проявлением течения времени в биологических системах являются биологические ритмы, которым подвержено и деление клеток в организме. Уникальной способностью к регенерации обладают пресноводные плоские черви - планарии, за счет наличия в организме более 30% стволовых клеток (необластов) от общего количества клеток. В теле планарий происходит конститутивная пролиферация необластов, обеспечивающая физиологическое регенерацию, причем ранее нами был обнаружен внутрисуточный ритм митотической активности стволовых клеток в теле этих животных. Целью данной работы являлось исследование зависимости митотической активности необластов планарий в зависимости от условий фоторежима.

В эксперименте использовали планарий вида *Schmidtea mediterranea*. Группы животных помещали в условия постоянного освещения, затемнения или чередования этих режимов с интервалом 12 ч. при одинаковых температурных условиях. После периода адаптации в каждой группе животных с периодичностью в два часа на протяжении суток фиксировали по 10 планарий. Всего исследовалось 12 временных точек. Митотические клетки в теле планарий выявляли методом иммуногистохимии с последующей микроскопией и подсчетом количества митотических фигур на единицу площади тела животного. Полученные данные усреднялись по результатам трех экспериментов.

Анализ митотической активности необластов в теле планарий показал, что динамика их пролиферации в случае 3-х различных режимов освещения значительно не отличались друг от друга. Таким образом, обнаружено отсутствие значимых различий во внутрисуточной динамике митотической активности при световом, темновом и чередующихся режимах освещения. Это свидетельствует о том, что ритм митотической активности стволовых клеток у планарий *Schmidtea mediterranea*, вероятно, способен задаваться эндогенным осциллятором.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-01517 а и № 15-04-05948 а.

28. Исследование действия ускоренных ионов углерода на когнитивную деятельность у мышей *in vivo*

Сорокина С.С.^{1*}, Мальков А.Е.¹, Шубина Л.В.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* sv0723@yandex.ru

Изучение механизмов лучевого воздействия на когнитивные функции человека является важной фундаментальной задачей радиобиологии.

Цель работы - исследование действия ионов углерода на когнитивную деятельность в экспериментах на мышах.

Эксперименты проведены на 2х-месячных самцах мышей (SHK, 32 г). Облучение пучком ядер углерода с энергией 450 МэВ/н в пике Брэгга в дозе 0.7 Гр осуществлено в помещении ВРБС на У-70 (г. Протвино). Через 2 месяца после облучения использован набор тестов для оценки общей активности, пространственного обучения, долговременной и кратковременной гиппокамп-зависимой памяти (открытое поле, лабиринт Барнса, распознавание нового объекта). После оценки когнитивной деятельности проведен гистологический анализ дорзального гиппокампа для оценки его морфологического состояния (окраска по Нисслию) и поздних признаков нейрональной дегенерации (флуоресцентная окраска FJB).

В результате проведенных экспериментов показано, что в группе облучённых животных по сравнению с контролем значительно снижена общая активность в тесте «открытое поле», свидетельствующая о развитии состояния тревожности. Обе группы животных продемонстрировали хорошее обучение в течение 3 дней в лабиринте Барнса, однако, в тесте долговременной памяти контрольные животные показали меньшее число ошибок в нахождении «норки»-мишени по сравнению с экспериментальной группой. Методом окрашивания по Нисслию выявлено снижение количества клеток в дорзальном гиппокампе в группе облучённых животных, причём наиболее выраженное уменьшение плотности клеток наблюдалось в хилусе зубчатой фасции экспериментальной группы. Кроме того, достоверно снижалась длина поля САЗс дорзального гиппокампа, и несколько уменьшалось количество клеток в нём. Эксперименты с применением FJB показали, что через два месяца после облучения у животных не наблюдалось FJB-положительного окрашивания в дорзальном гиппокампе. Таким образом, наличие гибнущих клеток как в экспериментальной, как и в контрольной группах, не обнаружено.

29. Клеточные реакции трех поколений потомков мышей, облученных ионизирующим и неионизирующим излучениями, *in vivo*

Дюкина А.Р.^{1*}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* Dyukina@rambler.ru

Целью работы было изучение свойств трех поколений потомков мышей, облученных малыми дозами ионизирующего (ИИ) и неионизирующего (НИ) излучений по тестам «радиочувствительность» и «адаптивный ответ» (АО) в цельной крови, в костном мозге и лимфоидных органах; скорости роста опухоли и выживаемости для выявления генетической нестабильности (ГН). Облучение животных инфракрасным светом (850 нм) проводили в течение 10 мин, красным светом (630 нм) - 5с и рентгеновским излучением (РИ) в дозе 0.1 Гр (0.1 Гр/мин), а затем все группы были облучены в дозе 1.5 Гр РИ. Животных контрольной группы облучали только в дозе 1.5 Гр. Уровень цитогенетических повреждений оценивали с помощью микроядерного теста. Уровень продукции АФК в цельной крови измеряли методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Относительную массу лимфоидных органов (тимус, селезенка), выживаемость и скорость роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха оценивали по стандартным методикам. Для получения первого поколения облученных ИИ и НИ самцов спаривали с необлученными самками. Полученное потомство в возрасте 2 месяцев облучали в дозе 1.5 Гр для определения радиочувствительности и по схеме АО 0.1Гр+1.5Гр. Обнаружено, что у потомков, облученных обоими видами излучений, в трех поколениях не наблюдается увеличения количества спонтанных повреждений как в костном мозге и в лимфоидных органах, так и в цельной крови по сравнению с потомками необлученных родителей. При дополнительном облучении потомков РИ в дозе 1.5 Гр наблюдалось снижение радиочувствительности и отсутствие АО по всем изученным критериям по сравнению с потомками необлученных мышей. Скорость роста опухоли не отличалась от таковой в контрольной группе, в отличие от родителей, а выживаемость, не отличалась от контроля, как и у родителей. Т.о., при исследовании свойств трех поколений потомков мышей, облученных низкими дозами ИИ и НИ, были обнаружены их отличия от свойств родителей, т.е. выявилась ГН.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-02-00808

30. Количественный анализ трансрентальной ДНК у старых крыс после рентгеновского облучения и введения метформина.

Каменских К.А.^{1,2}, Минкабирова Г.М.^{1,2}, Абдуллаев С.А.^{1*}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

* saabdullaev@gmail.com

Проведено сравнительное исследование экскреции внеклеточной ядерной ДНК и внеклеточной митохондриальной ДНК с мочой у 3 и 24 месячных крыс после их облучения (5 Гр) и введения метформина. Мочу крыс собирали у одних и тех же крыс до облучения и введения метформина, а также через 6, 12, 24, 72 часа после обработки. Анализ количества вк-ДНК в образцах мочи крыс, собранных до их обработки показал, что количество вк-ядДНК на 40% и вк-мтДНК на 50% выше в моче 24-месячных крыс, по сравнению с данными 3 месячных крыс. Количества вк-ДНК в моче молодых и старых крыс значительно различаются в зависимости от времени сбора мочи после их облучения и введения им метформина. Так, в моче молодых крыс через 12 часов после их облучения содержание вк-ядДНК и вк-мтДНК увеличивается на 390% и 430%, соответственно (относительно контроля). К этим же срокам, после облучения, в моче старых крыс регистрируется увеличение содержания вк-ядДНК на 520%, а вк-мтДНК на 680%. Через 6 после введения метформина крысам, также происходит увеличение содержания вк-ДНК в моче этих животных, но менее выражено. Количество фрагментов вк-мтДНК в моче молодых крыс, через 6 часов после введения им метформина, увеличивается на 60%. Количество фрагментов вк-ядДНК и вк-мтДНК в моче старых крыс, после введения им метформина значительно выше, по сравнению с данными молодых крыс. Так, в моче старых крыс через 6 часов после введения им метформина количество вк-ядДНК и вк-мтДНК увеличивается на 120% и 160%, соответственно. Таким образом, воздействие рентгеновских лучей и введение метформина приводят к значительному увеличению количества вк-ДНК в моче крыс, очевидно, связанному с активной клеточной гибелью. Результаты позволяют предполагать также, что метформин, в отличие от рентгеновских лучей, возможно, инициирует гибель клеток, содержащих структурно-функциональные нарушения, по механизму аутофагии. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов №12-04-31070, №16-34-00832.

31. Обратимое и необратимое механическое повреждение ДНК λ -фага при электрораспылении

Шляпников Ю.М.^{1*}, Морозов В.Н.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* shlyapnikov@online.stack.net

Электрогидродинамическое распыление растворов ДНК является перспективной методикой для масс-спектрометрии для генерации наноаэрозолей ДНК и для изготовлении микрочипов. Но влияет ли процесс электрораспыления на структуру длинных линейных молекул ДНК? Мы показали, что при любых условиях электрораспыления ДНК λ -фага подвергается значительной деструкции с образованием смеси фрагментов разной длины. Помимо фрагментации, наблюдаются обратимые изменения в структуре ДНК, проявляемые в повышенной электрофоретической подвижности молекул. Показано, что степень фрагментации уменьшается с длиной ДНК и с увеличением скорости потока через эмиттерный капилляр. Фрагменты короче 5 kbp не повреждаются при электрораспылении. Экспериментальные данные и теоретические оценки указывают на механический характер разрывов, которые могут происходить вблизи конуса Тейлора вследствие больших градиентов скоростей потока жидкости в этой области. Показано, что конденсация λ -ДНК с гексаамминкобальтом (III) полностью защищают молекулы ДНК от повреждений при электрораспылении. Полученные результаты позволяют существенно усовершенствовать технологические процессы, основанные на электрораспылении ДНК.

32. Увеличение пролиферативного потенциала фибробластов человека *in vitro* при действии ионизирующего излучения в малых дозах

Вележанинов И.О.^{1*}, Ермакова А.В.¹

1. ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия;

* vellio@yandex.ru

Ионизирующее излучение в высоких дозах вызывает преждевременное наступление клеточного старения и подавляет пролиферацию клеток млекопитающих. Однако, за последние три десятилетия было многократно показано, что облучение в малых дозах, как острое, так и хроническое, может активировать сигнальные каскады MAPK/ERK и PI3K/AKT/mTOR, приводя к стимуляции пролиферации клеток. Мы поставили перед собой цель проанализировать, не приводит ли радиационно-индуцированное усиление пролиферации к ускоренному истощению пролиферативного потенциала и раннему наступлению клеточного старения. Мы облучили эмбриональные фибробласты лёгких человека (ФЛЭЧ-104) на 21-23 пассажах в дозах 1, 3, 5, 9, 12, 15, 20, 50, 100 и 200 сГр и проанализировали динамику накопления стареющих клеток в облучённых культурах вплоть до полной остановки роста. Долю стареющих клеток оценивали с помощью окрашивания X-gal. Кроме того, с помощью ОТ-ПЦР оценивали экспрессию генов p21 и p16. В аналогичной серии экспериментов анализировали динамику пролиферации клеток путём оценки роста культуры простым подсчётом, а также с помощью метода FMCA. Впервые показано, что облучение в дозах 3 и 5 сГр приводит к замедлению клеточного старения фибробластов лёгких эмбриона человека и одновременной стимуляции пролиферации, то есть к увеличению пролиферативного потенциала. Мы предполагаем, что увеличение пролиферативного потенциала фибробластов является следствием более редкого наступления преждевременного стресс-индуцированного клеточного старения.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 16-34-00367.

33. Эффекты действия низкоинтенсивного светодиодного излучения различных длин волн на кровь и опухоль *in vitro*

Плеханова Е.С.^{1*}, Чернигина И.А.¹, Щербатюк Т.Г.¹, Чернов В.В.²

1. ФГБОУ ВО Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, Нижний Новгород, Россия;

2. ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Россия ;

* evgenya_plekhanova@mail.ru

Цель работы – оценить действие низкоинтенсивного светодиодного излучения (СДИ) длин волн 400, 460 и 660 нм на активность свободно-радикальных (СР) процессов крови и опухолевых клеток *in vitro*.

В биологическом материале, полученном от 12 половозрелых белых нелинейных крыс здоровых и с перевитым раком печени РС-1 на разных сроках роста опухоли, определяли содержание гемоглобина; индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ); активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Воздействовали СДИ с длинами волн 400, 460 и 660 нм и $D = 0,2158$ Дж/см². Источники - экспериментальные генераторы (ИПФ РАН, Нижний Новгород). Гомогенаты оптической плотности $1 \pm 0,05$ получали путем разведения взвеси клеток периферической зоны опухолевого очага в растворе Хенкса.

СДИ в плазме крови здоровых крыс усиливает интенсивность хемилюминесцентного свечения и подавляет общую антиоксидантную активность (АОА). СДИ в эритроцитах крови этих же животных не влияет на активность СОД и каталазы, но снижает содержание гемоглобина. В отличие от здоровых, у животных-опухоленосителей регистрируется более высокий уровень максимальной интенсивности ХЛ плазма крови, более высокая активность СОД и низкая концентрация гемоглобина в эритроцитах. СДИ в зависимости от стадии роста опухоли в плазме крови животных оказывает различное действие. На ранних сроках развития наблюдается усиление ХЛ свечения и подавление общей АОА, а на поздних - обратный эффект. СДИ в эритроцитах крови животных с опухолями поздних сроков роста ингибирует активность СОД и повышает концентрацию гемоглобина. При воздействии СДИ на гомогенаты опухолевых клеток наблюдается усиление ХЛ и угнетение общей АОА не зависимо от стадии роста опухоли.

Считаем, что полученные предварительные данные обосновывают необходимость дальнейшего исследования.

Медицинская биофизика

34. Активация ксенобиотиков митохондриальной цитохром b5 редуктазой и ее белками-партнерами

Никифорова А.Б.^{1*}, Куприянова Е.С.¹, Круглов А.Г.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* nikiforanna@yandex.ru

Некоторые соединения, попадая в клетку, восстанавливаются различными системами, в том числе митохондриальными. В восстановленном состоянии они способны продуцировать активные формы кислорода (АФК) и взаимодействовать с различными редокс-центрами. Данный механизм часто лежит в основе побочных эффектов некоторых лекарственных препаратов и ксенобиотиков. Систем ответственных за данное восстановление несколько, в том числе НАДН-зависимые системы внешней мембраны митохондрий.

В литературе существует несколько мнений о том, какой именно фермент отвечает за восстановление ксенобиотиков: потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), MOSC (1,2) и цитохром b5 редуктаза. Нами было показано, что VDAC и AIF не способны восстанавливать ксенобиотики за счет цитозольного НАДН. В данной работе мы продемонстрировали, что белки-партнеры цитохром b5 редуктазы – MOSC не принимают участия в восстановлении ксенобиотиков. Используя ингибиторы MOSC (ванадат и TTFA), мы показали, что в присутствии НАДН и ксенобиотиков, продукция АФК интактными митохондриями не изменяется.

Таким образом цитохром b5 редуктаза восстанавливает ксенобиотики за счет цитозольного НАДН. В настоящее время нами рассматриваются клетки линии НЕК 293 с нокдауном по митохондриальной цитохром b5 редуктазе. Снижение экспрессии данного белка не оказывает значительного эффекта на жизнеспособность клеток в физиологических условиях, но в присутствии ксенобиотиков наблюдаются значительные различия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-01158 мол_а, грантом правительства РФ (проект № 14.Z50.31.0028).

35. Влияние пониженной экспрессии транслокаторного белка (TSPO knockdown) на PK11195 и PPIX модулированную индукцию mPTP в митохондриях, изолированных из клеток глиомы C6

Ломовский А.И.^{1,2*}, Бабурина Ю.Л.¹, Одинокова И.В.¹, Азарашвили Т.С.¹, Крестинина О.В.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

* lomovskyaalex@gmail.com

Бензодиазепины используются в клинических исследованиях как мышечные релаксанты, как препараты противосудорожного и седативно-гипотонического воздействия, действуя через центральные бензодиазепиновый рецептор (ЦБР), расположенный в центральной нервной системе. Кроме того, бензодиазепины также связываются с другими рецепторами, находящимися в периферических тканях, астроцитах, глии и микроглии головного мозга. Транслокаторный белок (TSPO) – белок локализованный в периферических тканях, широко распространен в организме и выполняет различные биологические функции, такие как транспорт холестерина и стероидогенез, транспорт порфиринов, синтез гема, участвует в апоптозе и др. Было показано, что высокие уровни TSPO в линии клеток глиомы были связаны с высокой скоростью пролиферации и низкой степенью апоптоза. Кроме того, с недавнего времени предполагается, что TSPO является структурным компонентом неселективной Ca^{2+} индуцированной CsA-чувствительной поры (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), открытие которой может привести к развитию программированной гибели клеток. В настоящей работе исследовано влияние TSPO на транспорт Ca^{2+} при Ca^{2+} -индуцированном открытии поры в митохондриях, изолированных из клеток глиомы C6 крысы в присутствии/отсутствии синтетического лиганда PK11195 и природного высокоафинного лиганда протопорфирина IX (PPIX). Из клеток глиомы C6 выделялись митохондрии и при помощи многофункциональной ячейки измерялись митохондриальные параметры, такие как пороговая $[Ca^{2+}]$, скорость входа Ca^{2+} в митохондрии. Мы сравнивали параметры функционального состояния митохондрий, изолированных из клеток глиомы C6 дикого типа и митохондрий, изолированных из клеток глиомы C6 с пониженным содержанием TSPO. В результате проведенных экспериментов была выявлена корреляция между изменением экспрессии TSPO, пороговой концентрацией Ca^{2+} и скоростью входа Ca^{2+} в митохондрии в присутствии лигандов TSPO (PK11195 и PPIX).

36. Гипофракционированное облучение солидной карциномы Эрлиха у мышей на комплексе протонной терапии «Прометеус»

Шемяков А.Е.^{1*}, Заичкина С.И.¹, Балакин В.Е.², Розанова О.М.¹, Сорокина С.С.¹, Романченко С.П.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
 2. Физико-технический центр ФГБУН Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН;
- * alshemyakov@yandex.ru

В последнее десятилетие протонная лучевая терапия (ПЛТ) опухолей активно развивается во многих странах и рассматривается как альтернатива стандартной лучевой терапии. Специализированные медицинские центры ПЛТ занимаются лечением не только опухолей головы и шеи, но и раков простаты, молочной железы и т.д. Однако количество пациентов прошедших лучевую терапию протонами не сопоставимо с количеством больных, которые в ней нуждаются. Ограниченность использования ПЛТ связана не только с высокой стоимостью ускорителей, но и крайне скудным количеством исследований по действию протонов на организмы, и, как следствие, отсутствием знания фундаментальных основ специфики действия ускоренных частиц на критические структуры и процессы в нормальной и злокачественной клетках.

Цель. Изучение отдаленных последствий и динамики роста солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей прошедших облучение протонами в гипофракционированном высокодозном режиме в зависимости от объема облучаемой ткани и времени между фракциями, а также возможность использования АКЭ в качестве адекватной модели для отработки новых схем протонной терапии.

Эксперименты проводили на самцах мышей колонии SHK. Динамику роста АКЭ регистрировали по объему опухоли еженедельно. На 5-й день после инокуляции, животных наркотизировали и фиксировали на специальной платформе. Облучение проводили на терапевтическом комплексе протонной терапии «Прометеус». Мышей облучали двумя фракциями по 30 Гр с интервалами между ними от 4 до 24 ч.

Выводы: 1) более высокая противоопухолевая эффективность наблюдалась при облучении GTV объема опухоли по сравнению с PTV объемом мишени; 2) временные интервалы между фракциями не влияли на противоопухолевую эффективность облучения; 3) солидная форма перевиваемой АКЭ на мышах может быть использована в качестве удобной модели для отработки режимов гипофракционированного облучения животных. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего совершенствования методов адронной терапии.

37. Изучение антиоксидантных свойств структурно близких полифенолов.

Козина В.И.^{1,2*}, Шаталин Ю.В.^{1,2}, Шубина В.С.^{1,2}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский Государственный Естественно-Научный Институт, Пущино, Россия;

* ernie.nike@yandex.ru

Окислительный стресс вовлечен в развитие различных патологических состояний, в связи с чем проводятся многочисленные исследования, направленные на поиск и синтез новых эффективных антиоксидантов. Флавоноиды относят к категории биологически значимых антиоксидантов. Целью настоящей работы являлось комплексное изучение влияния шести структурно близких флавоноидов на развитие окислительного стресса в моделируемых условиях. На первом этапе исследований было установлено, что в системе, содержащей люминол, пероксид водорода и пероксидазу хрена, полифенолы проявляют антиоксидантную активность, которая увеличивается с числом гидроксильных групп в их структуре, тогда как наличие 2,3-двойной связи или карбонильной группы у С-4 атома оказывает существенно меньшее влияние. Исследование эффектов флавоноидов на продукцию АФК нейтрофилами, стимулированными ФМА, показало, что ингибирование интегрального хемилюминесцентного ответа клеток также увеличивается с числом гидроксильных групп. Незначительные изменения в структуре полифенолов приводят к изменению кинетических характеристик исследуемых процессов, позволяя говорить о различиях в механизме их действия. Исследование взаимодействия флавоноидов с ионами металлов переменной валентности показало, что все флавоноиды проявляют металл-восстанавливающую способность. Однако гесперетин и нарингенин проявляют наименьшую медь-восстанавливающую и незначительную железо-восстанавливающую активности.

Таким образом, наибольшую металл-восстанавливающую и антиоксидантную активность проявляют соединения, в структуре которых в В-кольце присутствуют гидроксильные группы, расположенных в орто-положении друг к другу. Данные, полученные в ходе настоящей работы, необходимы для прояснения механизмов действия соединений данного класса, и могут быть использованы для прогнозирования антиоксидантных свойств структурных аналогов исследуемых полифенолов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№14-44-03622, №15-04-02377).

38. Изучение уровня активных форм кислорода в лимфоцитах человека при воздействии амилоидных фибрилл из лизоцима

Венская Е.И.^{1*}, Скоробогатова А.С.¹

1. ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси", г.Минск, Беларусь;

* elv0719@gmail.com

Амилоиды – это фибриллярные структуры, образующиеся в организме человека вследствие мутаций и ошибок фолдинга. При отложении таких структур в органах развиваются патологии, названные амилоидозами. Например, отложение амилоидных фибрилл из лизоцима в печени, селезенке и почках приводит к развитию системного амилоидоза. Однако до сих пор не ясно, каков механизм повреждающего действия амилоидных фибрилл. Цель данной работы - изучить влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на процесс генерации активных форм кислорода (АФК) в лимфоцитах человека. Амилоидные фибриллы получали из лизоцима куриного яйца. Контроль образования амилоидных фибрилл осуществляли с помощью флуоресцентного зонда тиофлавина Т. О процессе генерации АФК судили по изменению кинетики флуоресценции зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H2DCFDA). Для стимуляции окислительных процессов в клетке использовали трет-бутилгидроперекись (t-BHP) в конечной концентрации 1 мМ.

Результаты экспериментов показали, что амилоидные фибриллы из лизоцима в конечной концентрации 20 мкг/мл при инкубации с лимфоцитами в течение 120 мин не оказывают влияния на уровень образования свободных радикалов в клетках по сравнению с контролем. При этом обнаружено, что амилоидные фибриллы усиливают окислительный стресс клеток, вызванный t-BHP. Так, при инкубации лимфоцитов в среде, содержащей амилоидные фибриллы и t-BHP в течение 30, 60, 90 и 120 мин интенсивность флуоресценции зонда в среднем на 30% больше, чем в образцах, проинкубированных только с t-BHP.

Таким образом, можно заключить, что сами амилоидные фибриллы не приводят к генерации АФК в лимфоцитах, но усиливают окислительный стресс, вызванный t-BHP.

39. Исследование стабильности биокатализатора на основе фицина, иммобилизованного на матрицах кислоторастворимого хитозана

Королева В.А.^{1*}, Холявка М.Г.¹, Ольшанникова С.С.¹, Артюхов В.Г.¹

1. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

* koroleva_victoria@bk.ru

Применение растворимых ферментов в медицине имеет ряд недостатков (дороговизна чистого препарата, быстрая инактивация, быстрое выведение из организма). Перечисленные затруднения в значительной мере могут быть устранены благодаря замене нативных ферментов на их иммобилизованные препараты.

Целью работы являлось исследование стабильности гетерогенного биокатализатора на основе фицина, иммобилизованного на матрицах кислоторастворимого среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов.

В качестве объекта исследования был выбран фицин (Sigma), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma), носителями для иммобилизации – кислоторастворимые среднемолекулярный ($M_r=200$ кДа, СД – 82 %) и высокомолекулярный ($M_r=350$ кДа, СД – 94.85 %) хитозаны (ЗАО «Биопрогресс»). Для сорбции фермента на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов использовали 0.05 М глициновый буфер с рН 10.0 и рН 8.6 соответственно.

Исследование стабильности растворимого фицина и гетерогенного биокатализатора мы проводили в течение двух суток по следующей схеме: инкубация образцов при 37 °С с измерением ферментативной активности через 1, 2, 3, 4, 5, 24 и 48 часов.

Анализ каталитической активности нативного энзима и гетерогенного ферментного препарата показал, что растворимый фицин инактивируется на 20 % после 3 часов инкубации и сохраняет не более 50 % от исходной активности после двух суток инкубации. Сорбированный на матрицах обоих хитозанов фицин высоко активен даже после двух суток инкубации (сохраняет не менее 65 % от исходной каталитической способности).

Таким образом, иммобилизация фицина на кислоторастворимых хитозанах препятствует его быстрой инактивации и увеличивает время полужизни препарата, что повышает перспективы его эффективного применения в медицинских целях.

1. Королева В.А. и др. (2015) Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация». № 4. С. 90-94.

2. Холявка М.Г. и др. (2013) Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. Т. 11. № 7. С. 29-35.

40. Лекарственная устойчивость клеток острого миелонобластного лейкоза, опосредованная гомотипической межклеточной адгезией

Кобякова М.И.^{1,2}, Захаров С.Г.³, Фадеев Р.С.^{1,2*}, Митина Т.А.³, Голенков А.К.³, Акатов В.С.^{1,2}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
2. Пущинский государственный естественно-научный институт;
3. Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), Москва;

* fadeevrs@gmail.com

Острый миелонобластный лейкоз (ОММЛ) – злокачественная опухоль гемопоэтической системы, которая характеризуется накоплением аномальных (лейкозных) бластных клеток, главным образом в костном мозге и нарушением нормального гемопоэза. Данное заболевание сопровождается инфильтрацией костного мозга лейкозными клетками, анемией и тромбоцитопенией.

Лекарственная устойчивость лейкозных клеток одна из основных причин недостаточной эффективности консервативной терапии острого миелонобластного лейкоза (ОММЛ). Важную роль в формировании лекарственной устойчивости лейкозных клеток играют факторы микроокружения, поэтому для выявления новых фармакологических мишеней необходимо понимание механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения.

В работе показано участие гомотипической межклеточной адгезии в повышении лекарственной устойчивости клеток острого миелонобластного лейкоза (ОММЛ) в многоклеточных агрегатах *in vitro*. Выявлено повышение устойчивости клеток ОММЛ в многоклеточных агрегатах к действию противоопухолевых антрациклиновых антибиотиков - доксорубицина, эпирубицина, идарубицина. А также показано, что подавление межклеточной адгезии клеток ОММЛ препятствовало возникновению данного вида устойчивости.

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендиального гранта Президента РФ (СП-1519.2015.4) и Правительства Российской Федерации (грант № 14.Z50.31.0028).

41. Модификация структурно-функциональных характеристик клеток селезенки мышей NMRI с асцитной карциномой Эрлиха в условиях фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода

Голубничая М.А.^{1*}, Лысенко Ю.А.¹, Артюхов В.Г.¹

1. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

* mgolubnichaja@gmail.com

Синглетный кислород (1O_2) является основным интермедиатом в реакциях фотосенсибилизированного окисления типа II, что используется в ходе фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Инфильтрирующие зону опухоли иммунциты, подвергаясь фотодинамическому воздействию, могут изменять свои функциональные характеристики и, возможно, модулировать ход реакций, приводящих к резорбции неоплазмы. С целью моделирования протекающих при этом процессов представляло интерес исследование фоточувствительности лимфоидных клеток в условиях их облучения красным светом в присутствии метиленового голубого (МГ).

В экспериментах использовали суспензию клеток селезенки здоровых мышей NMRI и животных с асцитной карциномой Эрлиха на 5, 7, 9 и 12 сут ее роста. Интенсивность генерации 1O_2 в системе оценивали с использованием 9,10-диметилантрацена. О степени модификации структурно-функциональных характеристик клеток в условиях темновой инкубации и облучения (665 нм; 9 Дж/см²) в присутствии МГ (10-4 моль/л) судили по изменениям: морфологии клеточной поверхности (растровая электронная микроскопия); концентрации клеток в суспензии; степени целостности клеточных мембран; уровня общей дегидрогеназной активности (ОДГ) клеток; внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , степени фрагментации ядерной ДНК.

В результате проведенных экспериментов нами выявлено, что облучение суспензии спленоцитов и последующая инкубация в течение 2, 4 и 24 ч сопровождаются нарушением целостности мембран клеток и уровня их ОДГ. Показано, что наибольшей фоточувствительностью в присутствии сенсибилизатора обладают спленоциты, извлеченные на 7 сут роста неоплазмы. Выявлено снижение концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме спленоцитов здоровых мышей через 4 ч после темновой инкубации и фотомодификации в смеси с МГ на 25 и 59 % соответственно. Установлено, что клетки селезенки, инкубированные с МГ, проявляют тенденцию к образованию более выраженных по сравнению с немодифицированными образцами клеточных протрузий.

42. Оценка эффективности материала «БИОГЛИСС» в качестве перспективного скаффолда для изготовления биопротезов клапанов сердца

Кузьмин М.В.^{1,2*}, Евстратова Я.В.^{1,2}, Соркомов М.Н.³, Бритиков Д.В.³, Фадеева И.С.^{1,2}, Акатов В.С.^{1,2}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;
2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;
3. НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН;

* mix.kuzmi2011@gmail.com

В настоящее время разработано множество методик коррекции сложных врожденных и приобретенных пороков сердца с применением различных биологических и биоискусственных материалов. Однако большое количество существующих биоматериалов-заменителей клапанов сердца и методик их изготовления свидетельствуют о том, что на сегодняшний день всё ещё не существует идеального биоматериала, поскольку в большинстве случаев развивается ряд специфических осложнений, прежде всего патологический кальциноз тканей, что приводит к необходимости реоперации пациентов.

В НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН помимо разработанного и внедрённого в клиническую практику биопротеза «Бионикс», формируемого из ксеноперикарда, был предложен для клинического применения новый клапан из глиссоновой капсулы печени крупного рогатого скота – «Биоглисс».

Для оценки эффективности клапанов «Биоглисс» использовали модель подкожной имплантации крысам с ограниченным (лавсановая камера с диаметром пор 0,2мкм), частично ограниченным (разгерметизированная лавсановая камера) и свободным (титановая камера с диаметром пор 50мкм) доступом клеток на срок 6 и 15 недель с последующим гистологическим и гистохимическим исследованием.

Обнаружено, что гистоспецифическое строение матрикса донорской ткани определяет предрасположенность биоматериала к развитию патологического кальциноза в организме реципиента.

В докладе обсуждаются основные использованные подходы и полученные результаты.

Работа проведена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «ФИМТ» (№ФИМТ-2014-136), Фонда содействия РМФП НТС, а также ГЗ ВУЗу (Проект №768).

43. Эффекты паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на динамику регенерации кожи при химическом ожоге

Евстратова Я.В.¹, Кочкина А.В.^{2*}, Новосёлов В.И.^{1,2}

1. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

2. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* a-kochkina@rambler.ru

В настоящее время в медицине остро стоит проблема поиска новых препаратов в терапии ожогов. В нашем исследовании была проведена оценка эффективности паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладающих прорегенераторным, противовоспалительным и антиапоптотическим действием, при химическом ожоге.

Объектами исследования служили крысы линии Wistar. В паравертебральной области спины создавали контактный ожог 50% трихлоруксусной кислотой. После нанесения ожога в паравертебральную область спины были сделаны инъекции: физиологический раствор (контрольная группа); паракринные факторы МСК. Оценку результатов проводили на основе динамического визуального, гистологического и иммуногистохимического анализов состояния раневой поверхности.

При использовании паракринных факторов МСК, реакция на наличие Ki-67 - позитивных клеток, активно выражена. Отмечается повышение интенсивности окраски не только клеток волосяного фолликула, но и клеток базального и шиповатого слоев эпидермиса кожи. В контрольной группе слабая окраска наблюдается в области волосяных фолликулов, где большинство клеток наружного и внутреннего корневых эпителиальных влагалищ волосяных фолликулов проявляли слабую реакцию на наличие Ki-67, что свидетельствует об их низкой пролиферативной активности.

Визуальная и гистологическая оценка эффективности применения паракринных факторов МСК на процесс регенерации кожи при химическом ожоге показала, что в контрольной группе регенерация кожи происходит дольше, чем в группе с лечением. Слой регенерата при лечении меньше, чем в контроле, видны активно пролиферирующие клетки верхнего слоя дермы. Таким образом, в данной работе было показана высокая эффективность применения паракринных факторов МСК при лечении химического ожога.

Структура и динамика белков, нуклеиновых кислот и их комплексов

44. Анализ пространственной структуры двух диоксигеназ - деструкторов нефти

Подпорин Д.А.^{1,2*}, Кондратьев М.С.¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия;

* dima.podporin.94@mail.ru

Улучшение свойств макромолекул, обладающих каталитическими свойствами является одной из ключевых задач биоинженерии. В первую очередь, это касается ферментов, имеющих непосредственное прикладное значение: например, деструкторов нефтепродуктов, катастрофические разливы которых, к сожалению, нередки. Известно, что свойства молекулы белка можно корректировать путем внесения аминокислотных замен, однако поиск мест для такого точечного мутагенеза представляет собой отдельную, не самую простую задачу. Обычно для определения параметров необходимых мутаций используются подходы, основанные на анализе гомологии мезофильных и термофильных белков, или же методы направленной эволюции. Однако, с развитием расчетных методов компьютерного моделирования, в том числе молекулярной динамики (МД), стало возможным оценивать эффективность планируемых замен еще до их осуществления в эксперименте.

Объектом нашего исследования является фермент катехол 1,2-диоксигеназа из двух штаммов бактерий *Acinetobacter radioresistens* (код pdb 2XSR, 306 аминокислотных остатков) и *Acinetobacter calcoaceticus* (код pdb 1DLM, 311 аминокислотных остатков). Моделирование этих ферментов важно для наших будущих исследований по улучшению их свойств: на основе концепции повышения стабильности малых глобулярных белков, которая была предложена в Лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН [Хечинашвили и др. 2006].

Мы выполнили текстовое и пространственное выравнивание аминокислотных последовательностей пары ферментов и установили среднюю степень их текстовой гомологии (50.81%), тогда как структурно их глобулы очень высоко гомологичны. Методом молекулярного докинга нами была исследована субстратная специфичность двух диоксигеназ, в качестве лигандов рассматривался ряд постепенно усложняющихся ароматических молекул: бензол – нафталин – антрацен. Выявлена зависимость аффинности связывания от молекулярной массы лиганда, для каждой из молекул показано предпочтительное место связывания.

45. Картирование S100P-специфичного сайта интерлейкина-11

Соколов А.С.^{1*}, Казаков А.С.¹, Соловьев В.В.², Пермяков С.Е.¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН;

2. ЗАО «Биокад»;

* 212sok@gmail.com

Интерлейкин-11 (IL-11) - гематopoэтический цитокин семейства интерлейкина-6 (IL-6), в котором сигналинг осуществляется посредством образования гетеротримерного комплекса с α - и β -субъединицами рецептора. IL-11 и IL-6 участвуют в онкогенезе и являются хорошо установленными мишенями для лечения рака. Ранее нами было обнаружено специфическое взаимодействие между IL-11 человека и онкобелком семейства S100, белком S100P человека. Комплекс не формируется при замене IL-11 на IL-6. Для картирования расположения S100P-специфичного сайта IL-11 два его участка, узнающие рецептор IL-11RA, были заменены на гомологичные участки белка IL-6: петля 79-90 ('L') и С-конец спирали D (остатки 184-201, 'H'). Полученные мутантные формы IL-11, '-L', '-H', '-L-H', показали измененное сродство к S100P: сниженное сродство у -L, и его отсутствие у -H и -L-H. При этом все мутанты IL-11 сохранили способность активировать STAT3 сигналинг в клетках HEK-Blue™ IL-6, трансформированных геном IL-11RA, а мутанты -H и -L-H обладают нативно-подобным гидродинамическим радиусом (Rh), говорящем о сохранности третичной структуры белка. Мутант -L показал увеличение Rh, при сохранности мономерности белка. Полученные данные свидетельствуют о влиянии замены С-конца спирали D на сродство IL-11 к S100P при сохранении структурных и функциональных свойств белка, что указывает на прямое или аллостерическое участие этой области белка в узнавании белка S100P. Учитывая полученные нами ранее данные по локализации IL-11-специфичного сайта в молекуле S100P, нами картировано расположение сайтов связывания обоих белков, что важно для понимания молекулярных механизмов развития онкозаболеваний, характеризующихся повышенным уровнем экспрессии IL-11 и S100P, включая несколько видов рака органов пищеварения, рак груди, яичников, простаты, и пр. Работа поддержана грантом Минобрнауки РФ №14.607.21.0097, RFMEFI60714X0097

Нейродинамика и нейробиология

46. Регуляция функционального состояния мозга человека методом частотно-фазовой синхронизации сенсорных стимулов с нисходящей фазой потенциала альфа-ритма ЭЭГ человека в режиме реального времени

Пушкин А.А.^{1*}, Лысенко Л.В.¹, Сухов А.Г.¹, Криволай А.Г.¹

1. Академия биологии и биотехнологии ЮФУ;

* artyompushkin@yandex.ru

В нейрофизиологии особую актуальность представляют исследования, направленные на изучение перестроек ритмической активности мозга под влиянием фазозависимых внешних воздействий. Поэтому целью настоящего исследования является разработка нового метода, позволяющего осуществлять регуляцию функционального состояния мозга посредством анализа в реальном времени амплитудно-частотных и фазовых характеристик электроэнцефалограммы, автоматического выделения определенных паттернов эндогенной пейсмекерной активности и управления различными режимами стимуляции для достижения желаемой постстимульной активации или депрессии мозговых ритмов.

Для реализации поставленной цели, нами использовался блок обработки параметров ЭЭГ и управления стимулирующими воздействиями (БОиУ), разработанный в НИИ нейрокибернетики ЮФУ. Изучение влияния сенсорной стимуляции, синхронизированной в режиме реального времени с определенными фазами α -волн на механизмы долговременной пластической перестройки α -ритма человека осуществлялось при использовании аналогового 8-ми канального электроэнцефалографа «Биоскрипт БСТ-112» (ГДР). Сигналы с выходных каскадов аналогового электроэнцефалографа «Биоскрипт БСТ-112» подавались на входные каналы БОиУ. Активный электрод, используемый для определения фаз α -волн и организации сенсорной стимуляции, располагался над правой затылочной областью (О2). Необходимая фаза α -волны в БОиУ детектировалась посредством сравнения отсчетов отфильтрованной ЭЭГ с мгновенными значениями амплитуд опорного синусоидального сигнала. В дальнейшем зрительный стимул предъявлялся на нисходящие фронты фаз фоновых α -волн ЭЭГ человека. Зрительные стимулы, подаваемые на нисходящей фазе α -волн, приводили к возрастанию мощности частот α -ритма в электрограммах мозга на 12-15%, зарегистрированных во время стимуляции по сравнению с фоновыми показателями мощности в отведениях О1, О2, Р3, Р4. Данный эффект сохранялся и после завершения сенсорной стимуляции на протяжении 1 минуты.

47. Non-muscle myosin dysfunction slows synaptic vesicle exocytosis rate at motor nerve endings

Хисамиева Г.А.^{1*}, Григорьев П.Н.¹

1. Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия;

* guzel13g96@mail.ru

Presumably non-muscle myosins may serve as a synaptic vesicle cycle regulatory mechanism. Non-muscle myosins are involved in the processes of learning, memory et al. It is known that activity of the myosin is regulated by phosphorylation/dephosphorylation processes. In the motor nerve endings the myosin may be phosphorylated by myosin-light chain kinase (MLCK) and Rho-associated protein kinase (rock). Synaptic vesicle exocytosis at the mouse motor nerve ending in case of blockade of MLCK and rock was studied. The Y27632 (10 mkM) and peptide RKKYKYRRK (10 mkM) were used as specific cell-permeable blockers of rock and MLCK, respectively; the motor nerve was stimulated by suprathreshold impulses (20Hz). D-tubocurarine (3-6 mkM) was used for prevention of skeletal muscle contraction. Fluorescent marker FM 1-43 fluorescence was used to estimate the rate of synaptic vesicles exocytosis, the preparations were viewed with the Olympus BX51W1 fluorescence microscope, equipped with LUMPLanFI 60x/0.9 objective lens and U-MNB2 filters. The high-frequency stimulation (1 min) of motor nerve in the presence of the marker (5mkM) lead to the FM 1-43 loading into synaptic vesicles underwent exo-endocytosis. The high-frequency stimulation of the preliminary stained with the marker preparations lead to decrease in fluorescence intensity but both RKKYKYRRK and Y27632 slowed the destaining rate during initial 2 min of stimulation. Thus impairment of non-muscle myosin phosphorylation leads to synaptic vesicle exocytosis rate in the motor nerve endings.

48. Влияние гипоксии на кальциевый гомеостаз клеток из различных отделов мозга *in vitro*

Туровская М.В.^{1*}, Туровский Е.А.¹

1. Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

* turovsky.84@mail.ru

Периферические хеморецепторы млекопитающих не чувствительны к местным отклонениям парциального давления кислорода (PO₂), которые могут происходить при изменении активности нейронов мозга. При этом головной мозг крайне чувствителен к снижению PO₂ и целостность нейро-глиальных сетей нарушается в период даже кратковременной гипоксии. Специализация различных отделов мозга может предполагать и различную чувствительность клеток к изменению PO₂. Мы постарались установить порог чувствительности клеток мозга при снижении PO₂, и сравнить Ca²⁺-ответы по амплитуде. С помощью флуоресцентной микроскопии регистрировали изменение [Ca²⁺]_i в культивируемых астроцитах и нейронах. Клетки получали из ствола, коры и гиппокампа мозга новорожденных крыс. Использовали культуры 8 DIV, загруженные зондом Fura-2. Гипоксические условия создавали в специальной вакуумной ячейке, в которой производилось измерение PO₂ с помощью соматического оксиметра.

Генерация Ca²⁺-сигналов в нейронах ствола мозга при снижении PO₂ происходит через 100с после начала гипоксии, что составляет 72 mmHg, в нейронах из коры мозга – через 370с (29 mmHg) и нейронах гиппокампа – 680с (около 11 mmHg). Что касается астроцитов, то клетки, полученные из ствола мозга, начинают реагировать через 87с (55 mmHg), астроциты коры – 450с (20 mmHg) и гиппокампа – 510с (11 mmHg). Амплитуды Ca²⁺-ответов при гипоксии сильно варьируют, однако, в среднем для нейронов и астроцитов ствола мозга составляют 0,11 и 0,18 у.е. флуоресценции, соответственно. Для клеток коры, амплитуды составляют – 0,07 (нейроны) и 0,11 (астроциты), а для клеток гиппокампа – 0,07 (нейроны) и 0,1 (астроциты).

Нами показаны различия в чувствительности к гипоксии у нейронов и астроцитов из различных отделов мозга. Наиболее чувствительными клетками оказались астроциты и нейроны ствола мозга, тогда как клетки коры и гиппокампа начинают отвечать Ca²⁺-сигналами при более существенном снижении PO₂ и с меньшими амплитудами. Работа поддержана грантом РФФИ №16-34-00159.

49. Изучение механизмов действия нейротоксиканта хлорида триметилолова на мозг крыс

Першина Е.В.^{1,2*}, Архипов В.И.^{1,2}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

2. Пущинский государственный естественно-научный Институт, Пущино, Россия;

* pershina-ev@mail.ru

Эксперименты проводили на самцах крыс Вистар, которым вводили нейротоксикант хлорид триметилолова (ТМТ) в дозе 7,5 мг/кг, п/к и противосудорожный агент (этамилал-натрий). После инъекции ТМТ масса тела животных за два дня заметно снизилась и не менялась в течение одной недели, но через три недели после ТМТ крысы контрольной и опытной групп по этому показателю не различались. Через одну неделю после ТМТ животных обучали навыку чередования в лабиринте с четырьмя отсеками. Как оказалось, динамика обучения животных опытной группы не отличалась от контроля, однако при изменении одного из подкрепляемых отсеков, крысы совершали больше ошибок, чем в контрольной группе. Мы полагаем, что это свидетельствует о нарушенной функции гиппокампа. Морфологические исследования подтвердили гибель нейронов в поле СА3 гиппокампа. Механизмы гибели нейронов при интоксикации ТМТ окончательно не установлены, хотя известно, что значительную роль играют митохондриальные повреждения, индуцированные особым белком станнином. Однако через 6 недель после ТМТ уровень экспрессии генов станнина в гиппокампе, как оказалось, близок к контрольному, что указывает на несущественное значение этого белка как маркера повреждения нейронов на данном этапе интоксикации. Возможной причиной гибели нейронов, может быть глутаматная эксайтотоксичность, о важной роли которой в механизмах действия ТМТ свидетельствуют результаты исследования уровня экспрессии генов метаболитных рецепторов глутамата (мГлу). Например, через 6 недель после инъекции ТМТ было обнаружено выраженное снижение уровня экспрессии постсинаптического мГлу5 рецептора в гиппокампе, что указывает на компенсаторное снижение глутаматергической нейротрансмиссии. Изменения в уровне экспрессии генов мГлу рецепторов выявляют перспективные направления в поиске нейропротективных средств.

Работа поддержана грантом РФФИ-мол_а № 16-34-01167

50. Как формируется тета-ритм в гиппокампе. Вычислительная модель.

Мысин И.Е.^{1*}

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* imysin@mail.ru

Тета-ритм - это важнейший из ритмов мозга и коррелирует когнитивных функций, выполняемых гиппокампом, таких как память, внимание. В литературе распространено мнение, что тета-ритм в гиппокампе формируется при участии медиальной септальной области (МСО), нейроны которой разряжаются на тета-частоте и посылают свои проекции в гиппокамп. В множестве работ по этой теме показано, что ведущую роль в синхронизации гиппокампальной сети играют септальные ГАМКергические нейроны, содержащие парвальбумин. В работе (Bothegeyi et al, 2004) было показано, что популяция септальных проекционных ГАМКергических нейронов содержит две субпопуляции, разрезающиеся 0 и 152 градусах тета-ритма. В этой же работе было сделано предположение, что одна из субпопуляций тормозит корзинчатые нейроны, а другая OLM нейроны гиппокампа, ритмично растармаживая тело и опикальный дендрит пирамид. В данной работе мы проверили эту гипотезу в вычислительной модели. Модель содержит пирамидные (100 штук), OLM (5 штук) и корзинчатые (5 штук) нейроны, все нейроны описывались с помощью формализма Ходжкина-Хаксли. Пирамидные нейроны содержали два компартмента - сому и дендрит. Ритмический вход из МСО моделировался двумя случайными потоками импульсов, плотность потока менялась по синусоидам на тета-частоте, сдвинутыми на 152 градуса. Численное моделирование показало, что в такой системе формируются устойчивый тета-ритм, схожий по форме с описанным в литературе. Также наша модель предсказывает хорошую синхронизацию пирамидных нейронов между собой и увеличение их привязки к фазе тета-ритма, что также соответствует литературным данным. Таким образом, полученные данные указывают на правомерность высказанной выше описанной гипотезы. Другое следствие - это синхронизация пирамидных нейронов в очень коротком диапазоне времени (40 мс), несмотря на то, что период тета-ритма составляет 120 мс. Таким образом предложенная модель является перспективной с точки зрения рассмотрения информационных процессов в гиппокампе в будущем.

51. Нарушение работы немышечного миозина замедляет процессы экзоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях

Хисамиева Г.А.¹, Григорьев П.Н.^{1*}

1. Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия;

* guzel13g96@mail.ru

Предположительно, одним из регуляторных механизмов пресинаптического везикулярного цикла могут служить немышечные миозины. Миозины оказались вовлечены в процессы обучения, памяти и др. Известно, что изменение активности немышечных миозинов обеспечивается их фосфорилированием/дефосфорилированием. Обнаружено, что в нервных окончаниях процесс фосфорилирования миозина происходит при участии киназы легких цепей миозина (MLCK) и Rho-ассоциированной киназы (rock). В экспериментах на нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши с использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии исследовались процессы экзоцитоза синаптических везикул в условиях блокады MLCK и rock. Раздражение двигательного нерва производилось сверхпороговыми прямоугольными импульсами с частотой 20 Гц, в качестве специфических мембранпроникающих блокаторов MLCK и rock были использованы, соответственно, пептид RKKYKYRRK (10 мкМ) и органический блокатор Y27632 (10 мкМ), которые добавлялись в перфузионный раствор за 60 мин до начала раздражения. Блокирование сокращений мышечных волокон осуществлялось с помощью d- тубокурарина (3-6 мкМ). Свечение флуоресцентного красителя FM 1-43 наблюдали на микроскопе Olympus BX51WI, оснащенного объективом LUMPLanFI 60x/0.9 и комплектом светофильтров U-MNB2. Высокочастотное раздражение двигательного нерва контрольных препаратов продолжительностью 1 мин в присутствии красителя FM 1-43 (5 мкМ) приводило к захвату красителя процессами эндоцитоза синаптических везикул и увеличению свечения нервных терминалей. Высокочастотное раздражение предварительно окрашенных препаратов приводило к быстрому падению интенсивности свечения нервных терминалей; обнаружено, что как RKKYKYRRK, так и Y27632 замедляли динамику падения свечения в первые две минуты раздражения. Таким образом, нарушение фосфорилирования миозина снижает интенсивность процессов экзоцитоза синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях при высокочастотном раздражении.

52. Нейронная активность зависит от скорости протока инкубационной среды в экспериментах *in vitro*.

Мурай В.М.^{1*}, Мальков А.Е.¹, Попова И.Ю.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* raveninshadow@rambler.ru

Хотя стандартные методики работы с переживающими срезами существуют много лет, и с помощью них проведено большое количество исследований на различных частях мозга, опубликовано крайне мало работ, анализирующих соответствие параметров нейронной активности в условиях *in vivo* и *in vitro*. В данной работе был проведен сравнительный анализ нейронной активности медиальной септальной области (МСО) мозга в разных экспериментальных условиях: *in vivo* и *in vitro* при разной скорости протока инкубационной среды с целью выяснения условий более приближенными к физиологическим. В качестве изменяемого параметра была выбрана скорость протока инкубационной среды (4 и 8 мл/мин), т.к от нее напрямую зависит целый ряд показателей, и в первую очередь - концентрация O₂ в срезе. Было показано, что от скорости протока зависит распределение септальных нейронов по паттернам активности. При скорости протока инкубационной среды 8 мл/мин достоверно выше потенциал покоя септальных нейронов, чем при скорости 4 мл/мин. Показано, что действие блокатора ГАМК_A-рецепторов меняется на противоположное при повышении скорости протока вдвое. Эти результаты указывают на прямую зависимость функционирования ГАМКергической тормозной сети МСО от доступности кислорода в ткани мозга. Впервые в экспериментах *in vivo* показан паттерн ответов спонтанно активных нейронов МСО на электрическую стимуляцию афферентных волокон. Показано, что ответы нейронов МСО на афферентную стимуляцию в условиях повышенной оксигенации в экспериментах *in vitro* подобны таковым условиям *in vivo*. Благодаря этой работе усовершенствован метод регистрации нейронной активности в условиях *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-99683 и грантом Президента МК-6378.2016.4.

53. Хроническое подавление гликолиза ведет к развитию гипервозбудимости в мозге экспериментальных животных.

Мальков А.Е.^{1*}, Самохина Е.И.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* malkovae@gmail.com

Нарушения метаболизма, выявляемые как снижение утилизации глюкозы в мозге, являются принципиальным фактором риска для ненаследственной эпилепсии. Однако причинно-следственная связь между гипометаболизмом мозга и гипервозбудимостью остается неизвестной. Для установления данной связи в нашей лаборатории была разработана модель хронического экспериментального энергодефицита: в течение месяца крысы ежедневно получали внутривенные инъекции неметаболизируемого аналога глюкозы 2-дезоксиглюкозы (2ДГ). Было обнаружено, что хроническая аппликация 2ДГ вызывает генерацию эпилептиформной активности у изначально здоровых животных. В экспериментах на переживающих срезах гиппокампа было показано снижение устойчивости полевой активности к среде с низким содержанием глюкозы, что свидетельствует об истощении энергетических запасов в мозге экспериментальных животных. Была проведена серия экспериментов на одиночных гранулярных нейронах зубчатой фасции. Методом пэтч-кламп регистрировались токи через одиночные каналы NMDA и ГАМК рецепторов. Вольтамперная характеристика данных каналов позволяет оценить мембранный потенциал покоя и потенциал реверсии токов через ГАМК рецепторные каналы. Было показано, что, хотя потенциал покоя исследуемых нейронов не изменялся в условиях хронического энергодефицита ($-79,3 \pm 2,3$ мВ и $-82 \pm 2,43$ мВ, $n=29$; $p>0,2$), потенциал реверсии ГАМК токов был существенно деполяризован ($-67,2 \pm 3,99$ мВ, по сравнению с $-83,7 \pm 3,41$ мВ в контроле, $n = 29$; $p<0,01$). Данный факт свидетельствует о нарушении ГАМКергической трансмиссии в мозге крыс с экспериментальным энергодефицитом, которое, безусловно, вносит вклад в формирование эпилептиформной активности, обнаруженное *in vivo*. Таким образом, наши результаты подтверждают предположение о том, что хронический энергодефицит может являться единственной причиной развития гипервозбудимости мозга, проявляемой как на уровне популяционной активности, так и на уровне отдельных нейронов. Работа поддержана грантами РФФИ (№15-34-20871, №14-44-03682).

Новые методы в биофизических исследованиях

54. Разработка высокочувствительного и быстрого способа определения ДНК с помощью микрочипов

Михайлович Ю.М.^{1*}, Морозов В.Н.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* shlyapnikov@online.stack.net

Имеются многочисленные литературные данные по выявлению биологических молекул, в том числе и патогенов, с помощью иммуноферментного анализа, основанного на взаимодействии антиген-антитело. Для повышения чувствительности метода В.Н.Морозовым впервые было предложено использовать активный способ проведения анализа на микрочипе в специально изготовленной проточной ячейке, включающий электрофоретический сбор антигена и детекцию сигнала с помощью магнитных частиц, используемых в качестве меток. В настоящей работе этот подход успешно развит для ультрачувствительного и быстрого выявления фрагментов ДНК. Для этого методом электрораспыления изготовлены микрочипы с иммобилизованными олигонуклеотидами, комплементарными к определяемой ДНК. Показано, что иммобилизованные молекулы олигонуклеотидов сохраняют свои функциональные свойства на микрочипе. Подобраны условия проведения электрофоретического сбора анализируемой ДНК, такие как скорость потока образца через камеру и величина электрического поля. Определены условия для отжига определяемых фрагментов ДНК на микрочипе и для детекции суперпарамагнитных меток с применением магнитного поля. Предварительные результаты свидетельствуют о повышении чувствительности анализа в 1000 раз по сравнению с неактивным методом.

Работа поддержана грантом РФФИ №15-15-00086 и стипендией Президента РФ.

Биофизика супрамолекулярных систем

55. Изучение влияния полиэлектролитов на ферментативную активность алкогольдегидрогеназы, в связи с проблемой создания микродиагностикумов многоразового использования.

Мусин Е.В.^{1*}, Ким А.Л.¹, Тихоненко С.А.¹, Дубровский А.В.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* eglork@gmail.com

Целью работы является изучение каталитических свойств алкогольдегидрогеназы (АДГ) при ее взаимодействии с полиэлектролитами (ПЭ) в растворах с различной ионной силой. Данное исследование является новым витком развития технологии создания полиэлектролитных микрокапсул (ПМК) с инкапсулированными ферментами, которые станут достойной заменой нативных ферментов.

В рамках данной работы изучено влияние отрицательно заряженных полистиролсульфоната (ПСС) и декстрансульфата (ДС) и положительно заряженного полидиаллилдиметиламмония (ПДАДМА) на структуру и активность АДГ методами флуоресцентной и оптической спектроскопии.

Нами показано, что ДС и ПДАДМА не влияют на структурные и каталитические свойства фермента. ПСС за 1 ч инкубации незначительно снижал величину собственной флуоресценции белка, что связано с частичным разрушением его четвертичной структуры.

Изучение АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС показало, что активность фермента зависела как от времени инкубации, так и от влияния ПСС. Также было обнаружено, что в присутствии ПСС фермент инактивировался значительно сильнее, чем свободный, при этом соотношение полиэлектролита к белку не влияло на активность.

Ранее уже было показано, что моно- и дивалентные соли влияют на каталитические и структурные свойства комплекса лактатдегидрогеназы с ПСС, однако в нашем исследовании продемонстрировано, что добавление в реакционную смесь хлорида натрия (2 М и 0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М) не уменьшало разрушающего действия ПСС на четвертичную структуру белка, но в то же время частично снимало негативное влияние ПСС на активность отдельных субъединиц, за счет предотвращения образования дисульфидных мостиков между сульфогидрильными (-SH) группами.

Изученные взаимодействия ПЭ с АДГ имеют принципиальное значение для развития технологии конструирования полиэлектролитных ферментных микродиагностикумов.

56. Разрушение оболочки и выход белка из микрокапсул, состоящих из небiodeградебельных полиэлектролитов.

Дубровский А.В.^{1*}, Кочеткова О.Ю.¹, Ким А.Л.^{1,2}, Мусин Е.В.^{1,2}, Тихоненко С.А.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;
2. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

* dav198@mail.ru

Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК), изготавливаемые методом поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов на дисперсные частицы нано- и микро размеров с последующим разрушением и удалением этих частиц, являются объектами новой быстро развивающейся области — полимерной нанотехнологии. Полученные к настоящему времени результаты демонстрируют широкие возможности использования ПМК при разработке нового класса химических и биохимических реакторов и изучения особенностей протекания физических и химических процессов в малом объеме при создании нового типа зондов и высокочувствительных сенсоров. Кроме того, ведется активная разработка ПМК для создания лекарственных препаратов пролонгированного действия с управляемой доставкой и контролируемым высвобождением. Для успешного решения таких задач необходимо знать динамику высвобождения инкапсулированных веществ и деградации оболочки.

В данной работе методом флуоресцентной спектроскопии исследованы деградация оболочки полиэлектролитных микрокапсул, состоящих из полиаллиламина (ПАА) и полистиролсульфоната (ПСС) и выход белка из них в присутствии NaCl и (NH₄)₂SO₄ в разных концентрациях, а также при pH 5 и 7,4. Установлено, что высокая концентрация хлорида натрия (2 М) приводит к заметной диссоциации ПАА с верхнего слоя оболочки, что, по-видимому, связано с ее разрыхлением под действием ионной силы. Методом оптической спектроскопии было изучено количество ПАА, содержащегося в микрокапсуле. Из этих данных следует, что в 2М хлориде натрия в раствор выходит порядка 20% полимера; в отсутствие ионной силы в раствор выходит лишь небольшое его количество (около 2%). Повышение значения pH раствора до 7,5 также вызывает отслаивание ПАА, однако этот эффект уменьшается примерно в 2 раза при повышении температуры до 37°C из-за упорядочения и уплотнения оболочки. Установлено, что инкапсулированный белок практически не выходит из микрокапсул вне зависимости от присутствия в среде солей, их концентрации и pH среды.

57. Создание биосенсорных диагностических пластин

Ким А.Л.^{1*}, Мусин Е.В.¹

1. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

* kimerzent@gmail.com

Целью работы является создание нового типа сенсорных систем, многократного использования, удобных для применения в медицинской диагностике и мониторинга биотехнологического производства. Такие сенсорные системы выполнены на основе полиэлектролитных нано- и микрокапсул (ПМК), закрепленных на твердом носителе и содержащие внутри своего пула каталитически активные ферменты. Комплекс, образованный таким путем, представляет собой диагностическую пластину (ДП).

Закрепление ПМК на твердом носителе стало возможным в результате проведенных экспериментов по нанесению полимерных слоев на кварцевую пластину. В работе использовали полиэлектролиты: полистиролсульфонат натрия (ПСС), полиаллиламин гидрохлорид (ПАА), полиэтиленимин (ПЭИ).

ПМК содержащие фермент получали путем поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на составных микросферолитах CaCO₃-фермент, используемых в качестве ядра, который затем растворяли в ЭДТА.

Активным компонентом ДП является фермент, инкапсулированный в ПМК. Структура полимерных слоев ДП полупроницаема, что позволяет сохранить доступ анализируемого субстрата к реакционным центрам фермента, одновременно фермент изолирован от действия протеолитического воздействия внешней среды. Таким образом данная диагностическая пластина может использоваться как многократный инструмент диагностики, не требующий предварительных очисток анализируемого раствора.

Результаты, полученные при многократном применении диагностической пластины, показали, что свойства инкапсулированной уреазы сохраняются, независимо от количества инкубаций. Отклонения результатов не превышают порога в 8,75%, что полностью удовлетворяет требованиям МЗиСР РФ.

Алфавитный указатель авторов по номерам тезисов

- Абдуллаев С. А. 30,
Абдуллатыпов А. В. 20,
Абрамов А. Ю. 4,
Азарашвили Т. С. 35,
Айбуш А. В. 6,
Акатов В. С. 17, 40, 42,
Артюхов В. А. 26,
Артюхов В. Г. 20, 39, 3, 2,
22, 41,
Архипов В. И. 49,
Асеев Н. А. 15,
Бабурина Ю. Л. 35,
Балабан П. М. 15,
Балакин В. Е. 36,
Балашова В. Н. 24,
Басманов Д. В. 19,
Белова А. М. 19,
Бережнов А. В. 4,
Бобылёв А. Г. 23,
Бритиков Д. В. 42,
Велегжанинов И. О. 32,
Венская Е. И. 38,
Вихлянцев И. М. 23,
Голенков А. К. 40,
Голубничая М. А. 41,
Гордеева А. Е. 7,
Григорьев П. Н. 51, 47,
Гюппенен М. А. 2,
Дубровский А. В. 56, 55,
Дынник В. В. 5,
Дюкина А. Р. 29,
Евстратова Я. В. 43, 42,
Ермак Т. В. 13, 8,
Ермаков А. М. 27, 25,
Ермакова А. В. 32,
Ефремова Д. С. 3,
Заичкина С. И. 36,
Закирьянов Ф. К. 24,
Залесский А. Д. 6,
Захаров С. Г. 40,
Звягина А. И. 7, 17,
Знобищева А. В. 25,
Зыкова Е. А. 13, 8,
Иванов В. К. 21, 16,
Казаков А. С. 45,
Калмыков Л. В. 12,
Каменских К. А. 30,
Камзолова С. Г. 11,
Каминский Ю. Г. 1,
Ким А. Л. 56, 57, 55,
Кирсанова П. О. 17,
Клинов Д. В. 19,
Кобякова М. И. 40,
Козина В. И. 37,
Колосов П. М. 15,
Колтаков И. А. 22,
Кондратьев М. С. 18,
Кондратьев М. С. 20, 44,
Королева В. А. 39, 26,
Косенко Е. А. 1,
Костров А. Н. 6,
Кочеткова О. Ю. 56,
Кочкина А. В. 43,
Крестинина О. В. 35,
Крещенко Н. Д. 27,
Криволай А. Г. 46,
Круглов А. Г. 34,
Крутинин Г. Г. 11,
Крутинина Е. А. 11,
Кузьмин М. В. 42,
Куприянова Е. С. 34,
Лазарев В. Н. 19,
Лазуренко Д. М. 10,
Ломовский А. И. 35,
Лысенко Л. В. 46,
Лысенко Ю. А. 41,
Макин С. М. 20,
Мальков А. Е. , 28, 53, 52,
Маркелова Н. Ю. 9,
Минайчев В. В. 17,
Минкабиров Г. М. 30,
Митина Т. А. 40,
Михайлович Ю. М. 54,
Морозов В. Н. 31, 54,
Мурай В. М. 52,
Мусин Е. В. 56, 57, 55,
Мысин И. Е. 50,
Надточенко В. А. 6,
Наквасина М. А. 3, 2,
Никифорова А. Б. 34,
Новоселов В. И. 7,
Новосёлов В. И. 43,
Одинокова И. В. 35,
Ольшанникова С. С. 39,
Ольшанникова С. С. 26,
Орлов М. А. 13, 8,
Осипов А. А. 14, 15, 11,
Осыченко А. А. 6,
Пермяков С. Е. 45,
Першина Е. В. 49,
Плеханова Е. С. 33,
Подпорин Д. А. 44,
Попов А. Л. 21, 16,
Попова И. Ю. 52,
Попова Н. Р. 21, 16,
Просвирина А. А. 17,
Пушкин А. А. 46,
Розанова О. М. 36,
Романченко С. П. 36,
Рощин М. В. 15,
Рясик А. А. 13, 8,
Сазыкина С. М. , 26,
Самохина Е. И. 53,
Селезнева И. И. 21, 16,
Серобян Г. А. 6,
Скавуляк А. Н. 27,
Скоробогатова А. С. 38,
Соколов А. С. 45,
Соловьев В. В. 45,
Соркомов М. Н. 42,
Сорокин А. А. 13, 8,
Сорокина С. С. , 28, 36,
Сухаричева Н. А. 9,
Сухов А. Г. 46,
Сырчина М. С. 6,
Телешев А. Т. 17,
Тихоненко С. А. 56, 55,
Тихонова Л. А. 1,
Токмакова Е. В. 3,
Туровская М. В. 5, 48,
Туровский Е. А. 5, 48,
Фадеев Р. С. 17, 40,

Фадеева И. С. 17, 42,
Федотова Е. И. 4,
Фесенко Н. И. 17,
Хисамиева Г. А. 51, 47,
Холявка М. Г. 20, 39, 26,
Хотина В. А. 2,
Чернигина И. А. 33,

Чернов В. В. 33,
Чеснокова Е. А. 15,
Шаталин Ю. В. 37,
Шемяков А. Е. 36,
Шилова Е. В. 22,
Шляпников Ю. М. 31,
Шубина В. С. 37,

Шубина Л. В. , 28,
Щербаков К. А. 18,
Щербатюк Т. Г. 33,
Якупова Э. И. 23,
Якушевич Л. В. 24

ISBN 978-5-9908139-1-5

