

СЕКЦИЯ «БИОЛОГИЯ»**ПОДСЕКЦИЯ «БИОФИЗИКА И БИОИНЖЕНЕРИЯ»****Жирные кислоты как регуляторы активности липазы****Беленова Алена Сергеевна**

аспирант

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

e-mail: alencal198322@mail.ru

В последние годы при усовершенствовании многих технологических процессов широко используются гидролитические ферменты микроорганизмов. Исследование физико-химических свойств, кинетико-термодинамических параметров, особенностей фермент-субстратных взаимодействий при осуществлении акта катализа гидролитическими ферментами способствуют существенному изменению и усовершенствованию многих известных технологий и созданию новых.

Среди всех существующих методов установления механизмов ферментативных реакций одним из наиболее простых и полезных является метод ингибирования продуктами реакции. В связи с этим нами было изучено влияние олеиновой и стеариновой кислот на физико-химические свойства липазы из *Rhizopus niveus*.

Определение каталитической активности исследуемых ферментных препаратов проводили спектрофотометрическим методом. Определение количества белка в препарате растворимой липазы осуществляли методом Лоури.

Показано, что воздействие олеиновой и стеариновой кислот в концентрациях 10⁻² – 10⁻³ моль/л не вызывает статистически достоверных изменений в активности липазы. Снижение каталитической активности фермента наблюдается при воздействии 1 моль/л олеиновой кислоты и 10⁻¹ моль/л стеариновой кислоты. Показано, что инкубация липазы с олеиновой кислотой в концентрации 3 моль/л приводит к снижению каталитической активности фермента на 61%, а инкубация фермента со стеариновой кислотой в той же концентрации – на 76 %.

Для выявления механизма ингибирования липазы олеиновой и стеариновой кислотами была изучена зависимость активности фермента от концентрации субстрата в присутствии олеиновой и стеариновой кислот и рассчитаны кинетические параметры реакции гидролиза (таблица 1).

Таблица 1. Кинетические параметры реакции гидролиза оливкового масла нативной липазой и липазой после инкубации с олеиновой и стеариновой кислотами.

Фермент	Кинетические параметры	
	K _m , моль/л	V _{max} , ед/мг
Нативная липаза	5,6*10 ⁻³	12,2
Липаза после инкубации с олеиновой кислотой (2 моль/л)	14,3*10 ⁻³	9,4
Липаза после инкубации со стеариновой кислотой (10 ⁻¹ моль/л)	14,7*10 ⁻³	9,1

Показано, что присутствие как олеиновой, так и стеариновой кислот приводит к смешанному ингибированию липазы.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Ковалевой Т.А. за помощь в подготовке тезисов

Гетерогенность светособирающих комплексов B800-850 в клетках *Alc.minutissimum*, выращенных в присутствии ингибитора каротиноидгенеза дифениламина

Большаков Максим Александрович

аспирант

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

E-mail: lfbv22@rambler.ru

Пространственная структура и спектральные характеристики светособирающих комплексов фотосинтезирующих бактерий детально исследованы. Однако вопрос о том, как отдельные компоненты (в частности, каротиноиды) встраиваются в структуру комплекса в клетке, остается открытым. Цель работы – исследовать принципы встраивания каротиноидов в периферический светособирающий комплекс B800-850 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc.minutissimum in vivo*. Для этого были изучены комплексы с разным составом и уровнем содержания каротиноидов. Клетки *Alc.minutissimum* выращивали, в присутствии разных концентраций ингибитора каротиноидгенеза дифениламина (3-12 мг/л). Было отобрано 4 образца, концентрация каротиноидов в которых варьировала в пределах от 2÷7% до 55÷70% от содержания каротиноидов в контрольном образце. Мембраны, выделенные из этих образцов, обрабатывали 2% додецилмальтозидом и нагревали в течение 0.5, 1, 2, 4, 8 и 12 мин при 80°C. Затем мембраны делили на комплекс B800-850 и зону свободных пигментов (разрушенные комплексы) методом электрофореза в полиакриламидном геле. Спектры поглощения полученных образцов регистрировали на спектрофотометре Cary 50. Анализ пигментов проводили методом ВЭЖХ на колонке Spherisorb ODS2, используя детектор с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu). Во всех исследованных образцах не только уменьшалось количество каротиноидов, но и изменялся их состав. По мере увеличения концентрации ингибитора в мембранах увеличивалось количество каротиноидов из более ранних стадий биосинтеза (ликопин, нейроспорин), а также так называемых предшественников (фитофлуин, фитоин). При нагревании образцов в первую очередь разрушались комплексы, которые или совсем не содержали каротиноидов или их содержание было резко уменьшено. Об этом свидетельствуют данные ВЭЖХ анализа, как зон свободных пигментов, так и комплексов B800-850, которые были выделены из образцов подвергнутых нагреванию в течение разного времени. Доля комплексов, которые выдержали нагревание, уменьшалась с увеличением времени нагревания. Одновременно в этих комплексах увеличивалось содержание каротиноидов. Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности популяции комплексов в клетках *Alc.minutissimum*, выращенных в присутствии ингибитора. Условно эту популяцию можно разбить на три части. 1 – комплексы без каротиноидов. Они преобладают в клетках при высоких концентрациях (12 мг) ингибитора. 2 – комплексы с низким содержанием каротиноидов из начальных этапов биосинтеза, которых больше при средних концентрациях ингибитора (6-9 мг). 3 – комплексы с высоким содержанием каротиноидов (до 60-90 % от контроля). Они обнаруживаются в мембранах при концентрации ингибитора 3-9 мг. Указанные данные свидетельствуют о том, что каротиноиды *in vivo* не встраиваются в комплексы равномерно. Очевидно, что *in vivo* существуют места сборки комплексов, которые контактируют с определенными ансамблями ферментов синтеза каротиноидов. От степени ингибирования этих ансамблей зависит, какие типы каротиноидов встраиваются в комплекс B800-850 *in vivo*.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 48516).

Автор выражает признательность д.б.н. Москаленко А.А. и к.б.н. Махневой З.К. за помощь в подготовке тезисов.

Возможные механизмы электрорецепции у человека

Бурыкин Юрий Геннадьевич, Ильина Анжелика Игоревна, Никитина Ольга Васильевна,

Пресман Мария Леонидовна, Соколова Александра Александровна

аспирант, студенты медицинского и биологического факультетов

Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

E-mail: yriig@yandex.ru

Системы детектирования слабых электрических полей представляют собой древние эволюционные образования. В животном мире электромагнитный канал приема и передачи информации, наряду с другими видами чувствительности, используется различными видами. Например, электрорецепторная система рыб позволяет воспринимать искажения генерируемого ими электрического поля близко расположенными объектами, что дает возможность осуществлять охоту, навигацию, определять размеры, форму, локализацию и электрическое сопротивление этих объектов [1, С.486-487]. Тело человека окружено высокоамплитудными полями трибоэлектрической природы, которые могут регистрироваться на расстоянии нескольких метров [2, С.10]. Специфических рецепторов, способных воспринимать электрические поля у человека не обнаружено. Однако, в эксперименте человек, не используя традиционные органы чувств, способен идентифицировать различные физические свойства объектов, находящихся в непосредственной близости от него, например, определять их цвет, форму, линейные размеры, род вещества.

Фотодокументально зарегистрированы специфические паттерны безусловно-рефлекторных двигательных реакций руки испытуемых, возникающих при идентификации тест-объектов, находящихся в непосредственной близости. Нами также исследовались амплитудно-частотные характеристики произвольно возникающей мелкой моторики правой руки испытуемых. Регистрация микроперемещений и запись кинематограмм производилась бесконтактным способом. Измерительный комплекс состоял из блока датчиков токовихревого типа, блока преобразователей и блока АЦП сопряженного с ЭВМ. Полученные данные обрабатывались с помощью запатентованной лабораторией биокibernетики и биофизики сложных систем программы, позволяющей исследовать хаотическое и стохастическое поведение динамических систем. В качестве параметров системы вводились амплитудные значения произвольных движений в частотном диапазоне от 0,2 до 40 Гц с шагом 0,2 Гц. При этом в многомерном фазовом пространстве производился анализ параметров многомерного параллелепипеда ограничивающего аттрактор движения вектора состояния системы.

Анализ динамики поведения вектора состояния нервно-мышечного системного комплекса (НМС) человека в фазовом пространстве показал, что изменение состояния окружающего пространства при помещении в него материальных объектов, имеющих различные физические свойства, специфическим образом изменяет состояние НМС. Ответные безусловно-рефлекторные двигательные реакции, возникающие при идентификации тест-объектов, образуют специфические паттерны и в фазовом пространстве имеют аттракторы, ограниченные многомерными параллелепипедами с определенными параметрами.

Литература

1. Смит К.Ю.М. Биология сенсорных систем / К.Ю.М. Смит; Пер. с англ. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2005. – 583 с.
2. Торнуев Ю.В., Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. Электрический портрет человека / Ю.В. Торнуев, А.П. Хачатрян, Р.Г. Хачатрян - М.: Изд-во ВЗПИ, 1990. – 191 с.

Модель искусственной жизни для исследования теоретико-эволюционных проблем

Голик Дмитрий Никитич

аспирант

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: enzyme@nm.ru

Современная теория эволюции, несмотря на очевидную бесспорность её основных постулатов, не даёт удовлетворительного объяснения ряду важных биологических феноменов. Например, оценка времени, необходимого для случайного образования белка длиной в 100 аминокислотных остатков, даёт величину, на много порядков превышающую время жизни вселенной – тогда как наблюдаемая скорость эволюции несоизмеримо выше. Существуют и другие трудности в эволюционной теории, такие, как проблема кооперативного взаимодействия и устойчивости экосистем, а также дифференциация экологических ниш. Для решения этих проблем предлагаются различные теоретические модели, однако в силу сложности биологических систем и большой величины отрезков времени, требуемых для осуществления эволюции, проверка этих теорий в эксперименте зачастую не представляется возможной.

Экспериментальная проверка подобных теорий становится возможной в рамках идеологии искусственной жизни (ИЖ). Эта идеология основана на постулате о том, что сущность жизни может быть отделена от её физического воплощения, т. е. жизнь может рассматриваться как некоторый математический объект. Искусственной жизнью в узком смысле называется компьютерная программа, реализующая эволюцию Дарвина среди виртуальных организмов («агентов»), представляющих собой алгоритм, записанный на некотором языке программирования. Перед агентами ставится некоторая задача, которую агент должен решить, и в зависимости от качества решения которой может размножиться или умереть – таким образом осуществляется естественный отбор. Динамика эволюции в системе ИЖ определяется задачами, стоящими перед агентами, способом кодирования алгоритма («генотипа») агента, способом размножения и мутирования агентов, а также способом межагентной коммуникации. Задача проектирования системы ИЖ заключается в построении модели, адекватно воспроизводящей одно или несколько свойств жизни, при этом минимальной по сложности описания. Такие модели неоднократно предлагались и реализовывались, и в этой области достигнуты определённые успехи, но основные феномены жизни (прежде всего неограниченная прогрессивная эволюция и рост биоразнообразия) остаются недоступными для воссоздания методами ИЖ.

Нами была предложена модель искусственной жизни, являющаяся попыткой обобщения предыдущих моделей, и разработан программный комплекс для создания систем искусственной жизни в рамках этой модели. Система позволяет широко варьировать параметры численного эксперимента, в то же время сохраняя относительную простоту. Генотип агента представляет собой программу на языке Форт. Задачи и управляющий модуль также представляют собой программы на этом языке, что позволяет легко изменять условия эволюции в очень широких пределах. Всё взаимодействие агентов с внешним миром (включая решение задач, размножение и коммуникацию с другими агентами) производится с помощью единого механизма обмена сообщениями.

В ближайшем будущем ожидается получить первые результаты численных экспериментов с моделью. Планируется дальнейшее развитие модели и программной системы, а также исследование адекватности модели и её модификаций в воспроизведении фундаментальных свойств жизни.

Введение в культуру *in vitro* растений – фиторемедиантов тяжелых металлов**Джетмекова Динара Ерболатовна**

студент

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан

e-mail: dinara26@rambler.ru

Растения в природе находятся под постоянным давлением антропогенных факторов, особое место среди которых занимают тяжелые металлы, которые вызывают в растениях торможение роста побегов и изменение формы листьев, хлороз и нарушение водного обмена. Одним из необходимых мероприятий по предотвращению влияния тяжелых металлов на животных и человека является очистка почв с помощью растений - аккумуляторов тяжелых металлов. Тяжелые металлы наиболее токсичны среди химических загрязнителей и сравнимы по уровню опасности с пестицидами. К очень токсичным относятся следующие химические элементы: Cu, Co, Ni, Zn, As, Se, Fe, Pb, Ag, Cd, Au, Hg, Pt.

В Казахстане загрязнение растений ионами тяжелых металлов в окрестностях крупных промышленных центров стало одной из наиболее актуальных экологических проблем. Аккумуляция металлов в нетоксичной форме является одной из жизненно необходимых функций растений для выживания в условиях сильного загрязнения среды. Использование методов биотехнологии позволяет получать растения-регенеранты на селективных средах с повышенными концентрациями тяжелых металлов. Такие растения обладают повышенной аккумуляцией ионов тяжелых металлов в почвах, что может повысить эффективность фиторемедиации почв.

Целью наших исследований являлось введение в культуру *in vitro* видов растений, растущих на загрязненных тяжелыми металлами почвах. Объектом исследований послужили генотипы злаковых, бобовых трав и растений из семейства сложноцветных, отобранных в аномальных по содержанию тяжелых металлов зонах произрастания в Акмолинской области.

Каллусогенез у дикорастущих трав индуцировали на среде Мурасиге и Скуга с добавлением различных фитогормонов – кинетина, БАП-6 и 2,4-Д. В результате анализа различных вариантов сред были подобраны оптимальные составы сред для культивирования *in vitro* с целью индукции каллусогенеза: концентрация 2,4-Д – 6 мг/л; БАП-6 – 2 мг/л; кинетин – 1 мг/л в среде Мурасиге и Скуга. Для получения селективных сред в среду Мурасиге и Скуга добавляли тяжелые металлы - Zn, Pb, Cd, Co в различных концентрациях. Оптимальной концентрацией тяжелых металлов для получения каллусов была среда Мурасиге и Скуга с добавлением тяжелых металлов в конечной концентрации: Pb – 10 мг/л, Zn – 1880 мг/л, Cd – 5 мг/л, Co – 713 мг/л.

Оценка каллусообразующей способности изученных генотипов показала, что на выбранных вариантах индукционной среды наиболее высокий выход морфогенного каллуса получен у волоснеца ситникового и череды. Такие культуры как дурнишник, сафлор обладали средней каллусообразующей и морфогенетической способностями.

Анализ регенерационной способности изученных культур показал, что наиболее высокая регенерационная способность также наблюдалась у череды и волоснеца ситникового. Бобовые растения – люцерна, донник имели очень низкий процент каллусообразования и регенерантных структур на средах с тяжелыми металлами.

Таким образом, в полевых условиях на загрязненных тяжелыми металлами участках уранодобывающих районов Акмолинской области были отобраны растения, которые изучены на возможность использования их в биотехнологическом процессе получения новых форм – аккумуляторов тяжелых металлов для фиторемедиации почв.

Экспериментальное и теоретическое исследование спектров кругового дихроизма цитохром с оксидазы

Дюба Артем Владимирович

студент

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: dyubon@gmail.com

Круговой дихроизм – чувствительный и информативный метод исследования механизма работы различных ферментов. Этот метод позволяет оценить симметричность поглощающей молекулы. Если молекула не имеет центра инверсии, то она неодинаково поглощает правополяризованные и левополяризованные световые волны, так как соответствующие дипольные моменты переходов не совпадают друг с другом. Поэтому метод кругового дихроизма применим к сложным ферментам, содержащим в своем составе асимметричные компоненты. Таким ферментом является цитохром с оксидаза, терминальный фермент дыхательной цепи митохондрий.

Среди работ, посвященных цитохром с оксидазе, исследования спектров кругового дихроизма занимают особое положение. С одной стороны, по этому вопросу имеются экспериментальные данные [1], с другой – им не дано надлежащего объяснения. Не выяснено, как соотносятся максимумы дихроизма и спектральные свойства основных вращающих компонент фермента – гемов а и а₃. Не решен вопрос о существовании экситонного взаимодействия между гемами. Кроме того, не дано квантовомеханического объяснения полученных спектров.

Нами зарегистрированы спектры кругового дихроизма цитохром с оксидазы из сердца быка *Bos Taurus* в полностью окисленном (а³⁺ а₃³⁺), полностью восстановленном (а²⁺ а₃²⁺) состояниях свободного фермента и фермента, связанного с лигандом (CN- и СО), а также в состояниях со смешанной валентностью (а²⁺ а₃³⁺, если фермент связан с ионом CN-, и а³⁺ а₃²⁺ при связывании фермента с СО). Полученные данные позволяют констатировать наличие экситонного взаимодействия между гемами. Кроме того, проведена аппроксимация полученных спектров суммой кривых нормального распределения с целью идентификации отдельных полос в спектре.

В нашей работе мы также представляем результаты теоретических расчетов, позволяющие интерпретировать наблюдаемую асимметричность низкоспинового гема а. Она может быть обусловлена несимметричностью заместителей порфиринового кольца (гидрофобного хвоста, с одной стороны, и формильной группы, с другой) либо влиянием белкового окружения. Асимметрия гема ведет за собой снятие вырождения перехода, который соответствует полосе Core в спектре поглощения фермента, т.е. расщепление по энергии В_x и В_y – переходов в порфириновом кольце. Один из них ответственен за поглощение правополяризованной волны, другой – левополяризованной компоненты.

На основе трехмерной структуры (PDB:1V54) рассчитаны энергетические уровни гема а (без гидрофобного хвоста), получены энергии и направления дипольных моментов В_x и В_y – переходов, ответственных за вращательные способности гема. Расчеты выполнены полуэмпирическим методом PM6 с помощью программного пакета MOPAC2007.

Литература

1. Tiesjema, R.H., and Van Gelder, B.F. (1974) Biochemical and biophysical studies on cytochrome c oxidase XVI. Circular dichroic study of cytochrome c oxidase and its ligand complexes // *Biochimica et Biophysica Acta*, 347, 2, 202-214

Роль brassinosterоидов в передаче сигналов зеленого света

Ефимова Марина Васильевна

старший преподаватель, кандидат биологических наук

Томский государственный университет, Биологический Институт, Томск, Россия

E-mail: stevia555@mail.ru

Браassinosterоиды (БС) - фитогормоны нового поколения, способные в малых дозах повышать урожайность сельскохозяйственных культур и увеличивать устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды. По сравнению с традиционными средствами защиты растений, БС снижают экологическую нагрузку на окружающую среду. Сравнительно недавно было сделано предположение о возможном участии БС в передаче светового сигнала. Световой контроль за БС может осуществляться на разных уровнях. Известно, что биосинтез, механизм инактивации БС, а также ответная реакция на БС находится под контролем фитохромов и фоторецепторов синего света (криптохромов). Однако, несмотря на подробное изучение данной проблемы, остается открытым вопрос о возможном участии БС в передаче светового сигнала. В настоящее время не рассматривалось взаимодействие зеленого света (ЗС) и БС. Рецепция сигналов ЗС изучена не достаточно, несмотря на то, что ЗС составляет значительную часть солнечной радиации. В 1995 году Ч. Лин предположил, что одним из рецепторов ЗС могут быть криптохромы.

Изучали роль БС (брассинолида, эпибрассинолида и гомобрассинолида) в передаче сигналов ЗС. Удобным модельным объектом для изучения регуляторной роли БС в морфогенезе растений и транскрипции хлоропластных генов на зеленом свету служит *Arabidopsis thaliana* экотипов Landsberg erecta (Ler) и Columbia (Col), для которого получены мутанты по фоторецептору CRY1 (hy4) и с нарушенным биосинтезом brassinosterоидов (det2). Реакция на БС в темноте проявлялась в ингибировании длины гипокотилия и корня Col, Ler и hy4, а также стимуляции роста осевых органов det2. Наибольшая биологическая активность в отношении проростков была показана для брассинолида, следующим по активности был эпибрассинолид для Col и det2 и гомобрассинолид для Ler и hy4.

15-минутное освещение проростков арабидопсиса ЗС ($\lambda = 532$ нм, 29 мкмоль/м²с) вызывало процессы, аналогичные действию экзогенных БС. ЗС активировал фотоморфогенез в проростках арабидопсиса дикого типа и мутантах.

Ингибирующее действие ЗС на рост гипокотилия det2 снималось экзогенными БС. Площадь семядолей Col и det2 при одновременном действии brassinosterоидов и ЗС значительно увеличивалась по сравнению с действием этих факторов по отдельности. При совместном действии ЗС и БС на морфогенез арабидопсиса дикого типа Ler и hy4 наблюдалось сложение эффектов в росте гипокотилия и площади семядолей.

Впервые показана дифференциальная регуляция БС транскрипции 16 индивидуальных хлоропластных генов, относящихся к различным функциональным группам пластома. Получены новые данные о том, что свет является необходимым фактором для проявления регуляторного действия БС и, с другой стороны, БС создает условия для активации транскрипции пластидных генов светом.

Таким образом, можно предположить, что рецепторы зеленого света могут использовать БС в качестве альтернативных посредников при передаче светового сигнала, приводящего к определенному морфофизиологическому ответу.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российских Фундаментальных Исследований (грант № 07-04-90831-моб_ст).

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Карначук Р.А. за помощь в подготовке тезисов.

Изучение ядерной локализации транскрипционного фактора Kaiso

Камалюкова Илназ Минсихатовна, Кантидзе Омар Леванович

студент, н.с.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

E-mail: ikamalyukova@gmail.com

Метил-ДНК-связывающий белок Kaiso принадлежит к семейству ВТВ/POZ-белков, большинство из которых являются транскрипционными репрессорами. Кроме того, данный белок имеет ДНК-связывающий домен, состоящий из трёх цинковых пальцев и специфически узнающий метилированную ДНК. Известно, что Kaiso принимает участие в процессах импринтинга и инактивации X-хромосомы. Кроме того, имеются косвенные данные, указывающие на роль Kaiso в регуляции клеточного цикла, однако чёткого мнения на этот счёт до сих пор не существует. Одним из подходов к изучению функций белка является анализ его внутриклеточного распределения. Внутриклеточная локализация – важный фактор, определяющий функции белка и его партнёров по взаимодействию. Ядерная локализация белка Kaiso была показана довольно давно. Однако именно в наших исследованиях при помощи иммуноцитохимического анализа было изучено внутриклеточное распределение белка Kaiso на всех стадиях клеточного цикла. Нами была обнаружена не характерная для этого белка локализация в области centrosом. Чтобы подтвердить данное наблюдение были проведены эксперименты по двойному иммуноокрашиванию с использованием антител против Kaiso и одного из centrosомальных маркеров – центрина. Данные результаты были получены как на первичных культурах клеток (эмбриональные фибробласты мыши, курицы и человека), так и на immortalized клетках (линии HeLa и HEK). Кроме того, было показано, что при транзientной трансфекции клеток плазмидой, содержащей ген химерного белка Kaiso-GFP, наблюдается та же centrosомальная локализация. В дальнейшем будут охарактеризованы белок-белковые взаимодействия Kaiso, оценена динамика взаимодействий в ходе клеточного цикла. Полученные данные позволят нам определить функциональную роль Kaiso в регуляции клеточного цикла, не связанную с регуляцией экспрессии других генов.

Влияние терагерцевого излучения на тонкопленочный препарат БСА***Капралова Ангелина Владимировна****студент**Новосибирский Государственный Технический Университет, Институт Лазерной
Физики СО РАН, НГТУ, Новосибирск, Россия**E-mail: kapralova@ngs.ru*

Альбумин – основной транспортный белок сыворотки крови, который представляет собой глобулу, состоящую из 607 аминокислотных остатков, обладает достаточно сложной пространственной структурой. Он является удобной моделью для изучения свойств глобулярных белков.

Цель работы – выявить эффект влияния субмиллиметрового (СММ) излучения на тонкопленочный препарат бычьего сывороточного альбумина (БСА), а также оценить его величину.

Для проведения эксперимента использовался бычий сывороточный альбумин (БСА). Источником излучения являлся субмиллиметровый лазер с оптической накачкой, длина волны излучения которого 81,5 мкм (мощность 10 мВт) и 261 мкм (мощность 20 мВт). В качестве образца для облучения, использовалась кварцевая полочка с нанесенной на нее пленкой БСА. Пленка получена путем высушивания раствора концентрации 1 мг на 1 мл в потоке воздуха при комнатной температуре. Контролем служила вторая подложка с препаратом, которая подвергалась тем же воздействиям что и экспериментальная, кроме облучения. Дальнейшее исследование образцов заключалось в регистрации УФ спектра в области 190-330 нм. Регистрация спектра производилась до и после облучения, с помощью двулучевого УФ спектрометра SHIMADZU UV-3101PC.

В результате экспериментов было установлено следующее: выявлено изменение интенсивности на спектре пропускания пика на длине волны 280 нм; общая форма спектров облученного и контрольного образца не изменилась. При разном времени облучения было установлено оптимальное время: облучения. При времени облучения 30 минут эффект наиболее ярко выражен. Влияние СММ излучения на образец на длине волны 261 мкм незначительное.

Таким образом, полученные предварительные данные не исключают наличие изменений конформации молекулы БСА, вызванных терагерцевым излучением.

Исследование антирадикальной и пероксидазоподобной активности комплексов природных полифенолов с металлами

Костюк Татьяна Владимировна

аспирант

Беларуский Государственный Университет, биологический факультет, Минск, Беларусь

О защитном действии природных полифенолов в условиях окислительного стресса опубликовано множество работ, однако, их использование в качестве фармакологических препаратов ограничивается низкой водорастворимостью. Взаимодействие различных природных полифенолов с переходными металлами приводит к формированию комплексов, более гидрофильных, чем исходные лиганды. Целью настоящей работы было исследование способности металлокомплексов природных полифенолов дезактивировать активные формы кислорода.

В работе были использованы комплексы ионов металлов (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) с рутином, таксифолином, (–)-эпикатехином, лютеолином и вербаскозидом. Антирадикальная активность определялась в рибофлавинсодержащей фотосистеме по степени торможения O^{2-} -зависимого восстановления паранитротетразолия хлористого (ПНТХ). Обнаружено, что комплексы переходных металлов с флавоноидами, обладают более выраженными антирадикальными свойствами, чем исходные лиганды (табл. 1).

Таблица 1. Концентрации комплексов полифенолов с металлами (1:1) и свободных лигандов, ингибирующие супероксидзависимое восстановление ПНТХ на 50% (мкМ)

Полифенолы	Свободные лиганды	Комплексы с металлами		
		Cu^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}
Рутин	9.0	0.50	2.7	2.5
Таксифолин	1.9	0.48	0.6	0.55
Лютеолин	14.2	0.80	2.5	2.5
(–)-Эпикатехин	1.3	0.32	0.3	0.3
Вербаскозид	3.4	–	6.0	6.1

Способность комплексов катализировать гомолитическое расщепление пероксида водорода с образованием гидроксильного радикала была количественно измерена по скорости окисления лиганда. Было обнаружено, что комплексы с Cu^{2+} обладают относительно слабыми каталитическими свойствами по сравнению с комплексами, содержащими Fe^{2+} . Маннит – классическая «ловушка» $\bullet\text{OH}$, ингибировал окисление лигандов только в концентрациях многократно превышающих концентрации металокомплексов (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что окисление лиганда, имеющее место при разложении H_2O_2 , является сайт-специфической реакцией.

Таблица 2. Скорость окисления (v , мкмоль/мин) лиганда (рутина, вербаскозида) при разложении пероксида водорода хелатированными ионами меди (II) и железа (II) в фосфатном буфере, без и в присутствии различных концентраций маннита (мМ).

Маннит	[Рутин- Cu^{2+}]*	[Рутин- Fe^{2+}]*	[Вербаскозид- Cu^{2+}]*	[Вербаскозид- Fe^{2+}]*
0	0.72 ± 0.1	7.20 ± 0.3	1.76 ± 0.1	9.50 ± 0.3
0.2	0.71 ± 0.1	6.85 ± 0.2	1.74 ± 0.1	9.35 ± 0.3
1.0	0.73 ± 0.1	4.46 ± 0.3	1.76 ± 0.1	8.93 ± 0.3
5.0	0.75 ± 0.1	3.11 ± 0.3	1.34 ± 0.1	7.67 ± 0.3

*-исходная концентрация комплекса полифенола с металлом (1:1) 50 мкмоль/л.

Таким образом, обнаружено, что антирадикальные свойства комплексов ионов металлов (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) с рутином, таксифолином, (–)-эпикатехином, лютеолином значительно выше, чем у свободных лигандов. Кроме того, металокомплексы природных полифенолов, особенно вербаскозид- Fe^{2+} , обладают пероксидазоподобной активностью и способны безопасно разлагать H_2O_2 .

Хитозан - потенциальная основа для препаратов от дисбактериоза кишечника**Куликов С.Н.¹, Долбин Д.А., Тюрин Ю.А.**¹старший научный сотрудник

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Казань, Россия

E-mail: kuliks@yandex.ru

Хитозан – природный аминополисахарид, в составе которого чередуются остатки глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Особенности структуры этого полимера обуславливают ряд привлекательных свойств – биodeградируемость, биосовместимость, иммуномодулирующие свойства [1]. Поликатионная природа хитозанового полимера обуславливает его антибактериальные свойства как в отношении грам-положительных так и грам-отрицательных бактерий, а также грибов [2]. Предполагается, что положительно заряженный хитозан взаимодействует с поверхностными структурами клеток, нарушает их нормальное функционирование, и, связываясь с цитоплазматической мембраной, нарушает её целостность [3]. Это позволяет использовать хитозан в медицинских целях в качестве составного компонента присыпок, гелей и мазевых форм при местном лечении инфицированных участков кожи. Возможно использование хитозана и для лечения дисбактериозов кишечника.

Перспективным считается направление по применению хитозана против условно-патогенных и патогенных бактерий, вызывающих дисбактериозы кишечника. В исследовании использовали хитозан («Хитан», ЗАО «Биопрогресс») [4]. Хитозан растворяли в натрий-ацетатном буфере с рН 6,0 до конечной концентрации 0,1%. Добавляли к раствору хитозана бактериальную суспензию, содержащую 107 КОЕ/мл. Инкубировали смесь на качалке 1 ч. при 37°C. После инкубации производили высеv на МПА для подсчёта количества выживших клеток.

Проведённое нами исследование *in vitro* показало, что хитозан обладает антибактериальным действием в отношении грам-положительных и грам-отрицательных микробов (табл. 1).

Таблица 1.

Виды бактерий	% гибели
<i>Staphylococcus aureus</i>	76±10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55±8
<i>Esherichia coli</i>	83±12
<i>Enterobacter agglomerans</i>	89±11

Таким образом, хитозан может быть использован как антибактериальное профилактическое средство от дисбактериоза кишечника.

Литература

1. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. Москва: Наука, 2002. 368 с.
2. Куликов С.Н., Долбин Д.А., Тюрин Ю.А. / Антибактериальные свойства низкомолекулярного хитозана при atopическом дерматите // Практическая Медицина. 2008. №1(приложение1). с.146-147.
3. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Долбин Д.А., Хайруллин Р.З. / Роль структуры в биологической активности хитозана // Вестник Казанского технологического университета. 2007. №6. с.10-15.
4. www.chitin.ru (Российское хитиновое общество)

Влияние таурина на функциональную активность тучных клеток и эритроцитов**Кушнарёва Елена Александровна, Брызгалова Надежда Юрьевна****Паршина Евгения Юрьевна***студент**аспирант**научный сотрудник**Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова**E-mail: ahizaria@mail.ru*

Применение в медицинской практике препаратов природного происхождения является перспективным из-за высокой биологической активности данных соединений с одной стороны и их низкой токсичности, с другой. Таурин (Тау, 2-аминоэтансульфоновая кислота) – конечный продукт метаболизма серосодержащих аминокислот, демонстрирует широкий спектр фармакологических эффектов. Предполагается, что основными механизмами действия Тау являются его антиоксидантные свойства и мембранно-модифицирующее влияние. Целью настоящей работы являлось выяснение возможных механизмов действия данного препарата на перитонеальные тучные клетки (ТК) и эритроциты (Эр) самцов крыс. Известно, что экзоцитоз ТК кальций-зависимый процесс и использование некоторых соединений (вещество 48/80, кальциевый ионофор А23187) является хорошей экспериментальной моделью для изучения мембранных процессов. Изучение препарата Тау в экспериментах *in vitro*, а также и *in vivo* с применением различных способов введения (пероральное, внутрибрюшинное, внутримышечное) показало отличия в наблюдаемых эффектах не только между экспериментами *in vitro* и *in vivo*, но и при использовании различных способов введения препарата животным. Так, Тау ингибировал стимулированную ионофором А23187 дегрануляцию ТК в экспериментах *in vitro*, в то время как повышал функциональную активность ТК после внутримышечного и внутрибрюшинного введения препарата животным. Тау не оказывал влияния на действие вещества 48/80 в экспериментах *in vitro*, однако кратковременно стимулировал выброс гистамина ТК при внутрибрюшинном и внутримышечном введении препарата. При пероральном применении Тау подобных эффектов не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о роли прямого и опосредованного действия Тау на процессы, связанные с изменением уровня внутриклеточного кальция, что в свою очередь указывает на возможную модификацию плазмолеммы клеток. Для более детального изучения влияния Тау на мембранные процессы в качестве объекта исследования были выбраны Эр животных. Все эксперименты проводились *in vitro*, при инкубации с препаратом в течение 1 часа в дозе 10^{-3} – 10^{-2} М. С помощью метода электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) обнаружено уменьшение микровязкости мембраны Эр крыс. Полученные данные были подтверждены методами осмотического, кислотного и перекисного гемолиза, показывающие большую чувствительность эритроцитов инкубированных с таурином к действию гемолитиков. Исследования функционального состояния гемоглобина методом спектроскопии комбинационного рассеивания (КР) выявили эффект снижения соотношения оксигемоглобина к дезоксигемоглобину что указывает на повышение кислородобеспечивающей способности Эр. Таким образом, в настоящей работе получены доказательства существенного влияния таурина не только на мембранные процессы, но и на функциональную активность клеток в целом, что в свою очередь, по-видимому, определяет его широкое фармакологическое действие на уровне всего организма.

Сравнительный анализ комплексообразования ДНК с координационными соединениями палладия и платины в растворе

Левыкина Елена Васильевна

студент

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: llevykina@gmail.com

Одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов является цис-дихлордиаминоплатина (цис-ДДП), которая образует координационные связи с азотистыми основаниями ДНК, блокируя процесс ее репликации. Наряду с высокой противоопухолевой активностью цис-ДДП, она обладает серьезными побочными эффектами: высокой токсичностью, отсутствием избирательного действия. Кроме того, довольно быстро наблюдается развитие резистентности организма к цис-ДДП, что не позволяет доводить лечение до конца. В связи с этим проводится поиск новых препаратов из числа координационных соединений, которые при той же эффективности были бы не столь губительны для организма. В литературе описан ряд соединений палладия, которые могут быть использованы вместо цис-ДДП. Отмечалась меньшая токсичность палладиевых комплексов по сравнению с аналогичными соединениями платины, а индуцированные палладием повреждения ДНК труднее репарировались. Так как молекула ДНК является основной мишенью для большинства противоопухолевых препаратов рассматриваемого класса, изучение способов связывания ДНК с координационными соединениями в растворе создает базу для направленного синтеза новых лекарственных форм.

Целью данной работы является изучение взаимодействия ДНК с координационными соединениями палладия, содержащими протонированные амины с общей формулой $[LH]_2[PdCl_4]$. Соединения морфодон и эфазол (см. рисунок) синтезированы в Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова (ИОНХ) в лаборатории д.х.н. И.А. Ефименко. Показано, что морфодон связывается с ДНК, вызывая изменение конформационных параметров макромолекулы. Комплексообразование сопровождается уменьшением объема молекулярного клубка и изменением вторичной структуры макромолекулы. Показано, что при комплексообразовании морфодона с ДНК связывание осуществляется через комплексный ион палладия в аквазированной форме, а морфолиновый лиганд не оказывает существенного влияния на структуру макромолекулы. Морфодон взаимодействует с ДНК, образуя координационную связь с N₇ гуанина.

Было проведено сравнение комплексообразования ДНК с морфодоном, эфазолом, цис- и транс-ДДП, $K_2[PdCl_4]$, $K_2[PtCl_4]$, $K_2[PdBr_4]$. На основании полученных данных предложены модели взаимодействия всех рассматриваемых соединений с ДНК.

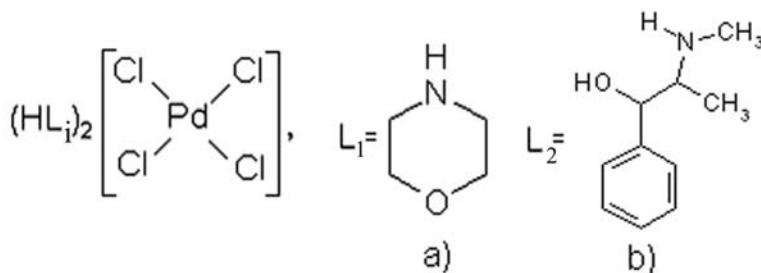


Рис. 1. Структура соединений морфодона и эфазола. Для морфодона L1 — морфолин (а), для эфазола L2— 1-фенил-2-метил-аминопропанол (б).

**Биофизические аспекты апоптоза лимфоцитов человека, индуцированного
воздействием активных форм кислорода**

Лидохова Олеся Владимировна, Трубицына Мария Сергеевна

аспиранты

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

e-mail: mst2905@mail.ru

Гибель клеток происходит как при нормальных физиологических процессах в организме, так и под действием различных неблагоприятных (физических, химических, биологических) факторов, в том числе оксидантов, и играет фундаментальную роль в развитии и функционировании многоклеточных организмов. Особое внимание в последние годы уделяется изучению роли активных кислородных метаболитов в развитии апоптоза (Зенков Н.К., 1999). Важным компонентом индукции апоптоза во многих типах клеток является свободный цитоплазматический кальций (Авдонин П.В., 1994).

С целью получения информации о взаимосвязи содержания вторичных посредников и реализации запрограммированной клеточной гибели иммуноцитов были исследованы изменения структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови доноров, суспендированных в растворе Хенкса, после экзогенной генерации активных форм кислорода (АФК): $1O_2$, $O\cdot_2$, H_2O_2 , $OH\cdot$.

Нами были изучены изменения уровня Fas-рецептора (CD95) лимфоцитов человека, запускающего процесс гибели клеток после их модификации вышеуказанными АФК в отсутствие и в присутствии ингибитора белкового синтеза циклогексимида (10^{-4} моль/л). Статистически достоверное повышение уровня CD95, не связанное с индукцией синтеза его новых молекул, в смеси лимфоцитов по отношению к контролю выявлено через 1 час после генерации АФК. В суспензии Т-лимфоцитов повышение изучаемого параметра по сравнению с интактными клетками зарегистрировано сразу и через 1-5 часов после генерации АФК. После 24 часов инкубации лимфоцитов, модифицированных воздействием супероксидного радикала и гидроксильного радикала, на электрофореграммах обнаружена картина «апоптотной лестницы», указывающая на фрагментацию ДНК. При помощи метода люминолзависимой хемилюминесценции выявлено повышение интенсивности свободнорадикальных реакций непосредственно после генерации H_2O_2 в суспензии и в цитозоле клеток, что может быть связано с образованием эндогенных АФК, способных запускать путь реализации апоптоза с участием митохондриальных компонентов. С использованием флуоресцентного зонда FURA-2 исследованы изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле лимфоцитарных клеток человека после генерации активных кислородных метаболитов. Установлено, что воздействие пероксида водорода и синглетного кислорода вызывает статистически достоверное увеличение концентрации кальция в клетке в 1,6 и 2,8 раз по сравнению с таковой интактных иммуноцитов. Полученные результаты указывают на участие фосфоинозитидного механизма передачи сигнала в лимфоцитарной клетке в процессе реализации рецепторопосредованного и митохондриального типов апоптоза, индуцированного АФК.

Литература

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Вольский Н.Н. (1999) Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи современной биологии. Выпуск 5.
2. Авдонин П.В., Ткачук В.А. (1994) Рецепторы и внутриклеточный кальций. М: Наука, 1994.

Авторы выражают признательность профессору, д.б.н. Артюхову В.Г. и профессору, д.б.н. Наквасиной М.А. за помощь в подготовке тезисов.

Нарушение аккумуляции церамида в резистентном к циклофосфану субштамме перевиваемой мышинной лимфосаркомы

Лукша Инна Олеговна¹, Мельникова Евгения Владимировна²

¹студентка, ²научный сотрудник

¹ГОУ ВПО Сибирский Государственный Медицинский Университет, Томск, Россия

²ГУ НИИ Молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск, Россия

E-mail: ioluksha@rambler.ru

Биоактивные сфинголипиды, такие как цермид, гликозилцерамид, сфингозин и сфингозин-1-фосфат (С-1-Ф) играют важную роль в различных аспектах онкологии участвуя в процессах апоптоза, клеточной пролиферации, миграции клеток, старении и воспалении. Эти регулируемые сфинголипидами процессы являются критическими при злокачественной трансформации и прогрессии, влияют на эффективность противоопухолевой терапии [1]. Перевиваемая мышинная лимфосаркома (LS), индуцированная нитрозометилмочевинной у самца линии СВА [2], и ее резистентный субштамм (RLS) являются моделью для изучения лекарственной устойчивости опухолей. Однократное введение циклофосфана (ЦФ) в дозе 100 мкг/кг мышам-опухоленосителям вызывает апоптоз клеток опухоли LS и ее полную регрессию, в то время как у мышей с трансплантантом RLS лишь незначительно снижается скорость роста опухоли. Определение сфинголипидов в опухолях LS и RLS представляло интерес в связи с их оппозитной чувствительностью к ЦФ. Методом тонкослойной хроматографии мы измерили уровень сфингомиелина (СМ), С-1-Ф и церамида в опухолях LS и RLS до и после введения ЦФ мышам с внутримышечными трансплантатами опухолей. Полученные результаты отражены в таблице (приведены значения величины медианы и стандартного отклонения). Статистическую обработку проводили, используя критерии Крускала-Уолиса и Манна-Уитни.

Опухоль	Время после воздействия ЦФ	СМ	С-1-Ф	Церамид
		мкг/г опухолевой ткани		
LS	контроль	0,8±0,27	1,4±0,5	0,6±0,08
	24ч	0,7±0,27	1,4±0,18	0,8±0,04*
	48ч	0,8±0,08	1,1±0,6	1,0±0,06*
	72ч	0,9±0,32	1,6±0,7	1,1±0,1*
RLS	контроль	0,9±0,33	1,42±0,27	0,7±0,09
	24ч	0,8±0,27	1,4±0,5	0,6±0,06*
	48ч	0,7±0,18	1,3±0,6	0,77±0,1
	72ч	0,7±0,16	1,24±0,5	0,36±0,05*

* - $p < 0.05$ относительно соответствующего контроля

Опухоли LS и RLS не отличались по исходному уровню изучаемых сфинголипидов. Количество СМ и С-1-Ф не изменялось под действием ЦФ. Церамид накапливался в клетках LS под действием ЦФ, что свидетельствует об индукции церамид-зависимого апоптоза. В клетках RLS отмечается снижение уровня церамида. Учитывая, что церамид участвует в активации сигналов апоптоза и может оказывать значительное влияние на эффективность противоопухолевой терапии, нарушение его аккумуляции может быть одной из причин резистентности RLS к ЦФ.

Литература

- Ogretmen B., Hannum Y.A. (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment//Nat.Rev.Cancer 4, 604-616.
- Каледин В.И. и др (2000). Циклофосфамид-индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях in vivo//Вопросы онкологии, 4, 5, 588-593.

Исследование влияния трансмембранного потенциала хлоропластов на характеристики флюоресценции хлорофилла

Максимов Евгений Георгиевич

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

fatman@butovo.com

Известно, что фотосинтетические мембраны зеленых водорослей и высших растений обладают сложной системой регуляции, позволяющей адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Ксантофиловый цикл (цикл каротиноидов), а также state transitions являются основными механизмами защиты фотосинтетических мембран от фотоповреждения. Запасание энергии в форме $\Delta\mu\text{H}$ приводит к закислению люмена и активации виолаксантиндеэпоксидазы, фермента превращающего виолаксантин мобильных антенных комплексов второй фотосистемы в антраксантин и затем в зеаксантин. В результате происходит понижение электронных уровней и каротиноид, ранее передававший энергию на хлорофилл, становится акцептором, способным тушить возбужденные состояния хлорофилла.

Целью данного исследования было изучение влияния $\Delta\mu\text{H}$ на скорость электронного транспорта, а также связь $\Delta\mu\text{H}$ и ксантофилового цикла.

В качестве объекта исследования использовались хлоропласты из листьев гороха (*Pisum sativum*), выделенные по методу Арнона. Способность хлоропластов генерировать $\Delta\mu\text{H}$ на свету была проверена методом замедленной флуоресценции (длительное послесвечение). Для сброса протонного градиента хлоропласты обрабатывали 10^{-7}M нигерицином. Суспензию хлоропластов адаптировали к темноте, а затем к свету высокой интенсивности.

В качестве методов исследования использовали импульсную флуориметрию с пикосекундным временным разрешением, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию комбинационного рассеяния. Для регистрации индукции флуоресценции хлорофилла использовали прибор Plan Efficiency Analyzer (PEA).

Анализ кинетик затухания флуоресценции хлорофилла показал, что $\Delta\mu\text{H}$, возникающий при освещении хлоропластов, приводит к снижению скорости электронного транспорта второй фотосистемы. Предварительная обработка хлоропластов 10^{-7}M нигерицином с последующим освещением приводит к менее значительным изменениям скорости электронного транспорта. В результате адаптации к интенсивному свету происходит значительное снижение квантового выхода флуоресценции хлорофилла для нативных хлоропластов, однако это не вызывает изменений квантового выхода образцов, обработанных нигерицином. Дифференциальный анализ спектров возбуждения флуоресценции и поглощения позволил обнаружить изменения спектров в области каротиноидов, связанные, вероятно, с работой ферментов ксантофилового цикла, исчезающие при диссепации $\Delta\mu\text{H}$. Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи процессов запасания энергии и регуляторных процессов, позволяющих защитить фотосинтетические мембраны от фотоповреждения.

Особенности кинетики Na^+, K^+ -активированного, Mg^{2+} -зависимого гидролиза АТФ зародышевыми клетками вьюна***Мандзинец Светлана Михайловна, Целевич Марта Владимировна****аспирант, доцент, к.б.н.**Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, Украина**E-mail: mcelevych@yahoo.com*

Na^+, K^+ -АТФаза принадлежит к АТФазам Р-типа. В структуре Na^+, K^+ -АТФазы сперматозоидов идентифицирована уникальная $\alpha 4$ -субъединица, ингибирование экспрессии которой приводит к угнетению их подвижности. Причем следует отметить, что Na^+, K^+ -АТФаза сперматозоидов играет ключевую роль как в обеспечении их подвижности, так и способности к оплодотворению яйцеклеток. Доказано, что при некоторых патологических состояниях организма значительно изменяется активность натриевой помпы, например при диабете и ишемии активность существенно снижается. Na^+, K^+ -АТФазе также принадлежит важная роль в обеспечении функциональной активности сократительных и подвижных клеток репродуктивной системы – миоцитов матки и сперматозоидов. Известно, что Na^+, K^+ -помпа определяет увеличение уровня ТМП и отвечает за осмотичность бластоцелия зародышей в раннем развитии вьюна. Как и каждый фермент, она характеризуется кинетическими и каталитическими свойствами, выяснение которых является необходимым для понимания как закономерностей функционирования Na^+, K^+ -помпы при физиологических условиях, так и при патологиях эмбриогенеза. Это в свою очередь будет иметь важное и актуальное значение для понимания роли реакции Mg^{2+} -зависимого ферментативного гидролиза АТФ в обеспечении внутриклеточного ионного гомеостаза зародышей в эмбриогенезе.

Получены данные, которые свидетельствуют, что кинетику Na^+, K^+ -активированного Mg^{2+} -зависимого гидролиза АТФ везикулами зародышевых клеток вьюна отражают кривые, которые имеют тенденцию к насыщению. Наиболее заметен этот эффект на стадиях развития 2, 16 и 64 бластомеров, что согласовывается с закономерностями реакции первого порядка в диапазоне времени 1-14 мин. На стадии 8 деления бластомеров характер насыщения имеет менее выраженный характер. Зависимость активности фермента зародышевых клеток от концентрации АТФ имеет двуфазный характер практически на всех исследуемых стадиях развития зародышей. K_m фермента несколько отличаются на протяжении стадий деления бластомеров, однако близки по значению (в диапазоне $\approx 2,5 \div 4,5$ мкМ) к тем, что характеризуют АТФ-зависимый транспорт Ca^{2+} везикулами ПМ клеток печени крыс. Такие величины K_m соответствуют физиологической концентрации Mg -АТФ в цитоплазме исследуемых клеток. На наш взгляд, Na^+, K^+ -АТФаза зародышевых клеток вьюна характеризуется достаточно высоким сродством к АТФ, это свидетельствует о наличии в молекуле фермента соответствующих каталитических центров.

**Генерация супероксид-аниона в процессе микробной трансформации
2,4,6-тринитротолуола: биохимические и токсикологические аспекты**

Науменко Е.А., Ложкин А.П., Субхангулова А.Р., Сырова А.В.

аспирант аспирант студент студент

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина

E-mail: enaumenko81@mail.ru

Производство и использование различных высокоустойчивых синтетических соединений приводит к загрязнению окружающей среды. Среди них большую опасность представляет 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ, тротил), наиболее часто применяемое взрывчатое вещество, синтез и использование которого приводит к загрязнению почв, воздуха, поверхностных и грунтовых вод. ТНТ и продукты его нитровосстановления относятся к числу токсичных, потенциально мутагенных и устойчивых загрязнителей, способных длительное время циркулировать в природных системах. ТНТ, помимо экологических аспектов его трансформации, представляет интерес как модель поведения нитроариллов в организме высших эукариот, поскольку они не только контактируют с этим веществом в условиях промышленных производств военного профиля, но и находятся под воздействием лекарств и пестицидов, молекулы которых содержат нитроароматические фрагменты.

Агентство по защите окружающей среды США отнесло ТНТ к числу наиболее опасных загрязнителей биосферы, и, в связи с этим, предотвращение контаминации и ремедиация ТНТ-загрязненных территорий признаны необходимыми в местах его производства и использования. Постоянное воздействие нитроариллов и их метаболитов на организм человека может привести к развитию таких заболеваний, как апластическая анемия, катаракта, нарушение функционирования печени, образование опухолей в мочевыводящей системе. Несмотря на растущий интерес исследователей к проблеме трансформации ТНТ в литературе практически отсутствуют сведения о вовлечении кислорода в данный процесс и связанное с ним образование активных форм кислорода (АФК) в системе ТНТ-бактериальные клетки.

С применением метода ЭПР нами была впервые показана возможность внеклеточной аккумуляции супероксида на раннем этапе микробной трансформации ТНТ, что представляет интерес в связи с высокой токсичностью данного радикала, которая проявляется в окислении липидов мембран, а также фрагментации ДНК, развитии воспаления, в повреждении сосудов. Данные эффекты частично связаны с собственной токсичностью супероксид-аниона, но основную роль, вероятно, играет образование вторичных активных форм кислорода, в том числе перекиси водорода и гидроксильных радикалов.

С позиций молекулярных основ токсичности ТНТ образование АФК принципиально важно, так как, вероятно, кислородные радикалы ответственны за проявление токсических свойств, выражающееся в развитии ряда характерных профессиональных заболеваний (катаракты, онкологических заболеваний, повреждении сосудов и т.д.). Необходимо отметить, что именно оксидативный стресс считается иницирующим фактором формирования катаракты. Поскольку обнаруженное нами образование супероксида клеточными суспензиями при контакте с ТНТ является общим для широкого круга тестированных микроорганизмов, вероятно, что микрофлора человека и высших животных, подвергающихся воздействию данного ксенобиотика, также способствует внеклеточному образованию супероксидного радикала, и это может вносить решающий вклад в проявление токсических и генотоксических эффектов ТНТ.

Варианты цитохрома с, несущие дополнительные мутации, направленные на понижение дыхательной активности белка.

Островерхова Т.В.¹, Пепелина Т.Ю.², Черткова Р.В.²

студент, аспирант, н.с., к.б.н.

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

E-mail: tato-tato@list.ru

Основной функцией гемсодержащего белка цитохрома с является электронный транспорт в дыхательной цепи. Цитохром с переносит электрон от убихинон-цитохром с оксидо-редуктазы (комплекса III) на цитохром с оксидазу (комплекс IV). Помимо этого, цитохром с обладает антиоксидантной активностью, т.е. способностью окислять супероксидный анион-радикал.

Основная задача настоящей работы состояла в получении вариантов цитохрома с, несущих мутации, направленные на понижение дыхательной активности белка, а также изучении взаимодействия мутантных вариантов цитохрома с с комплексами III и IV дыхательной цепи.

Варианты цитохрома с, несущие мутации K86W/K87C и K86E/K87E получены ранее, а также исследовано взаимодействие данных мутантных вариантов с комплексами III и IV. Мутантный вариант цитохрома с K86E/K87E имеет пониженную дыхательную активность по сравнению с мутантным вариантом K86W/K87C. Поэтому введение в ген лошадиного цитохрома с дополнительных мутаций осуществляли на основе варианта цитохрома с, несущего мутации K86E/K87E. Дополнительные мутации вводили в положения 72 и 69 в первом случае и в положения 27 и 90 во втором случае. В положениях 27 и 72 положительно заряженные остатки Lys заменены на отрицательно-заряженные остатки Glu. В целях сохранения суммарного заряда белка остатки Glu в положениях 69 и 90 заменены на положительно заряженные остатки Lys. Таким образом, получены два варианта цитохрома с, несущих мутации E69K/K72E/K86E/K87E и K27E/K86E/K87E/E90K.

Введение мутаций в ген лошадиного цитохрома с осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза (Stratagene, США). Полученные мутантные гены клонировали в плазмидный вектор pRSCYC1, используемый для ко-экспрессии генов цитохрома с и дрожжевой гем – лиазы. Данная плазмидная конструкция позволяет получать высокий уровень экспрессии гемсодержащего цитохрома с в штамме-продуценте *E.coli* (до 15мг/1л клеточной культуры). Выделение и очистку целевых белков проводили с помощью катионообменной и адсорбционной хроматографии.

Затем нами было изучено взаимодействие полученных мутантных вариантов с комплексами III и IV. Сукцинат цитохром с редуктазную активность комплекса III измеряли спектрофотометрически при 550 нм, цитохром с оксидазную активность комплекса IV полярографически. Каталитическая активность комплексов III и IV и сродство полученных мутантных вариантов E69K/K72E/K86E/K87E и K27E/K86E/K87E/E90K к ним сопоставимы с соответствующими значениями, полученными для ацетилированного цитохрома с. Таким образом, введение в мутантный ген цитохрома с K86E/K87E дополнительных замен E69K/K72E и K27E/E90K привело к значительному снижению дыхательной активности цитохрома с.

Трёхмерная структура калиевого канала Kv2.1 ΔС по данным электронной микроскопии

Пищальникова Анастасия Владимировна

студентка

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: bionastya@gmail.com

Калиевые потенциал-зависимые каналы (Kv) играют фундаментальную роль в генерации электрических импульсов и регуляции мембранного потенциала в мозге и нейронных синапсах, а также они могут вызывать патологии, в частности наследственные нарушения. Большое значение для понимания механизма функционирования и изменения активности ионных каналов играют молекулярные и структурные данные.

Все Kv каналы имеют сходную структуру, но размер внутриклеточного цитоплазматического участка может сильно варьировать в зависимости от типа канала. Строение этого участка представляет интерес в связи с потенциальным участием их N- и C- концев в регулировании активности каналов.

Относящийся к семейству потенциал-зависимых каналов, человеческий калиевый канал Kv2.1 широко распространен в центральной нервной системе, он также является доминирующим ионным каналом в нейроэндокринных и эндокринных клетках. Нарушения его функционирования могут приводить к развитию эпилепсии и диабета.

В настоящий момент мы экспрессировали в эукариотических COS-7 клетках нативный канал Kv2.1 и два его мутанта – Kv2.1ΔСТА (отсутствует цитоплазматический домен СТА) и Kv2.1ΔС (отсутствует С-концевой участок). Цель данной работы состояла в определении четвертичной структуры человеческого потенциал-зависимого калиевого канала Kv2.1ΔС.

Для изучения методом электронной микроскопии белковых молекул канала Kv2.1ΔС, очищенный белок наносился на медную сетку диаметром 3 мм, покрытую тонким слоем углерода в качестве подложки и окрашивался солями тяжелых металлов. Исследование полученных образцов производилось на микроскопе Philips Tecnaï G2 12 Spirit (FEI) с напряжением 120 кВ в условиях низкой дозы. Изображения были получены с увеличением 67 000. Отбор удачных изображений отдельных одиночных каналов Kv2.1ΔС для последующего построения 3D структуры проводился вручную с помощью программы Signature. На основе этих изображений с помощью компьютерной программы IMAGIC была получена объёмная структура канала Kv2.1ΔС.

Полученная трёхмерная структура мутантного канала с удалённым С-концевым участком состоит из двух основных доменов – большого, диаметром около 100Å и малого, диаметром около 40Å. Докинг существующей кристаллической структуры гомологичного Kv1.2 канала подтвердил, что больший домен является мембранным, а меньший – цитоплазматическим N-концевым доменом.

В настоящее время ведётся работа над улучшением разрешения мутантного канала Kv2.1ΔС и отработки способов очистки белка нативного канала Kv2.1 и Kv2.1ΔСТА. В дальнейшем планируется полученные трёхмерные структуры нативного и мутантных каналов сравнить между собой для определения местоположения удалённых цитоплазматических доменов. Все структуры будут выровнены относительно общего центра масс, и будет рассчитаны разностные изображения. Ожидаемые результаты позволят изучить пространственное расположение цитоплазматических доменов калиевого канала Kv2.1.

Автор выражает глубокую благодарность Соколовой Ольге Сергеевне за научное руководство.

Динамика процессов перекисного окисления в крови адаптированных к холоду половозрелых самцов крыс

Позднякова О.Н.

аспирант

Астраханский Государственный Университет, Астрахань, Россия

pozdnikova_olga@list.ru

Переохлаждение организма и формирование его устойчивости к холоду остается практически значимой проблемой физиологии и медицины. Кратковременные воздействия низких температур (продолжительностью до 1,5 часов) встречаются довольно часто как в повседневных, так и в экспериментальных ситуациях, но мало данных, касающихся ранних реакций адаптированного организма. Целью данного исследования являлось изучение динамики процессов окисления в крови половозрелых самцов крыс, адаптированных к холодovому воздействию. Для этого 70 половозрелых самцов беспородных белых крыс поодиночке содержали при температуре 4°C в течение 3 часов на протяжении 20 дней. На 21-е сутки крыс охлаждали 15, 30, 45, 60 и 90 минут, отдельно выделяли группу адаптированного и неадаптированного контроля. Промежуточные продукты перекисного окисления липидов (ПП ПОЛ) определяли по методу В.А. Волчегорского и соавторов. Степень перекисного гемолиза эритроцитов (ПГЭ) - методом А.А. Покровского и А.А. Абрацова в модификации, предложенной А.Е. Лазько, Р.И. Асфандияровым и А.А. Резаевым. Содержание продуктов окисления белков - по методу Е.Е. Дубининой. Динамика ПП ПОЛ отличается значительным увеличением их концентрации к 30 минуте воздействия ($p > 0,001$), их уровень остается повышенным до 60-ой минуты холодовой экспозиции, затем сокращается и возвращается к контрольным значениям. Уровень ПГЭ, отображающего степень устойчивости мембран эритроцитов к воздействию перекисью, имеет общую тенденцию к понижению, но статистически значимых различий с контролем выявлено не было. К 90-ой минуте экспозиции показатели ПГЭ у половозрелых животных приблизились к показаниям контрольной группы неадаптированных животных, в то время, как базовый уровень адаптированных крыс является более высоким, чем у интактного контроля. Динамика уровня алифатических альдегид-денитрофенилгидразонов основного характера (490 нм) разворачивается относительно завышенного базового уровня адаптированных животных ($p < 0,001$): первые 60 минут охлаждения их концентрация не изменяется. На 90-ой минуте отмечено их значительное сокращение ($p < 0,001$). Для динамики уровня алифатических кетон-динитрофенилгидразонов основного характера (540 нм) характерно колебание их уровня относительно адаптированного контроля: возрастание на 15-ой и 30-ой минутах и падение на 45-ой и 90-ой. Между динамикой продуктов СРО белков выявлен высокий уровень корреляции ($r = 0,94$).

Выявлен высокий уровень положительной корреляции между динамикой уровня ПГЭ и СРО белков плазмы (0,84 и 0,74 для 490 и 540 соответственно), возможно, значительная часть окисленных белков плазмы, имеют эритроцитарное происхождение. Статистически значимые различия между контрольными группами адаптированных и интактных животных были выявлены только для СРО белков ($p < ,001$), возможно, за время длительного охлаждения происходило накопление продуктов свободнорадикального окисления белков в то время, как ПП ПОЛ успевали утилизироваться из плазмы, к тому же известно. Для всех исследованных показателей характерно снижение после первых 60-ти минут воздействия и приближение данных к показателям интактной группы животных, что может свидетельствовать о реализации механизмов адаптации в первые 1,5 часа охлаждения, а также о быстром включении защитных систем.

Антимутагенная активность гидролизатов рогового вещества сайгака (*Saiga tatarica* L.)

Сафиуллина Д.Р.

студент

Казанский Государственный Университет им. В. И. Ульянова-Ленина, Казань, Россия

E-mail: daria.safiullina@gmail.com

Поиск антимутагенов – веществ, защищающих генетический аппарат клеток от повреждения, является необходимым [1]. Особое внимание на себя обращают природные препараты. Данные о составе и биологической активности гидролизатов рогов копытных, таких как сайгак, позволяют говорить об их биологически-активных свойствах. Спектр их биологической активности остается до конца не изученным [2]. Т.о., изучение возможной биологической активности компонентов гидролизатов рогов сайгаков представляет значительный научный интерес. Целью настоящей работы явилось изучение антимутагенных свойств гидролизатов рогов сайгака., отобранных на разных стадиях жизни животного. В соответствии с этим решались следующие задачи: характеристика токсических свойств гидролизатов рогового вещества сайгака; оценка возможности нейтрализации химических мутагенов (десмутагенных свойств) гидролизатами рогового вещества сайгака в тесте Эймса; оценка протекторных свойств гидролизатов рогового вещества по отношению к клетке (биоантимутагенных свойств) в тесте Эймса. Оценивали антимутагенную активность фракций: 1.7ДГВ и 3.7ДГВ - смесь аминокислот и пептидов, полученная при гидролизе тканей верхней трети рога сайгака возрастом 1 год 7 месяцев и 3 года 7 месяцев соответственно, отобранные у животного до гона; 1.7ПГВ - смесь аминокислот и пептидов, полученная при гидролизе тканей верхней трети рога сайгака возрастом в 1 год 7 месяцев, отобранного у животного после гона. Антимутагенную активность фракций оценивали в концентрациях 500 мкг/чашку, 100 мкг/чашку, 50 мкг/чашку. В работе использовался мутантный штамм *Salmonella typhimurium* TA100. Проверке на мутагенность предшествовала проверка токсичности соединений. Для определения предположительного механизма антимутагенных эффектов гидролизатов проводился тест Эймса в двух модификациях – с предварительной прединкубацией с исследуемыми фракциями и с непосредственным добавлением их в верхний агар. Антимутагенный эффект исследуемого соединения оценивали по числу колоний мутировавших под действием нитрозогуанидина бактерий. Тест на токсичность показал, что ни одна из фракций в использованных концентрациях не обладала токсическим эффектом. Установлено, что во всем диапазоне исследованных концентраций ни одна из фракций не обладала выраженным биоантимутагенным эффектом. Это может быть связано с метаболизацией гидролизатов. Одна из фракций, 1.7 ДГВ, обладает статистически достоверным десмутагенным эффектом. Для концентраций гидролизата 500 мкг/чашку, 100 мкг/чашку, 50 мкг/чашку снижение числа колоний ревертантов составило соответственно на 31%, 27%, и 23% по отношению к позитивному контролю. Остальные фракции не снижали число колоний ревертантов, что свидетельствует о возможном отсутствии у этих фракций десмутагенной активности.

Литература:

1. Гончарова Р.И. Антимутагенез как генетический процесс.//Вестн. РАМН.-1993-№1-23-33.
2. Романов О.Е., Лебедева А.И. Состав экстракта рогов сайгака в зависимости от физиологического состояния животных.//Селекционные и технологические основы повышения продуктивности сельскохозяйственных животных - Ярославль - 2003 - 208-212.

Экспрессия модифицированных генов глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius***Тойменцева А.А., Каримова М.Р., Шарипова М.Р.**

аспирант, студент, д.б.н. профессор

Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, Казань, Россия

E-mail: TojmencevaAA@mail.ru

Протеолитические ферменты микроорганизмов отвечают за комплексные процессы, обеспечивающие нормальную физиологию клетки. Они участвуют в ограниченном и селективном протеолизе полипептидов, посттрансляционном процессинге белков, клеточной дифференцировке и др. регуляторных процессах. Глутамилэндопептидаза, продукт гена *gseBi*, обладает высокой специфичностью к остаткам глутаминовой и аспарагиновой кислотам. Фермент представляет интерес для направленного синтеза олигопептидов. Однако на настоящий момент механизмы регуляции биосинтеза данного фермента изучены недостаточно.

Ген глутамилэндопептидазы *B.intermedius* клонирован на плазмиде Δ58.21 и секвенирован (EMBL, Y15136). Плазида, несущая ген *gseBi*, любезно предоставлена проф. С.В. Костровым, ИМГ РАН, Москва. Мы провели анализ регуляторной области гена фермента с целью идентификации потенциальных сайтов связывания с рядом регуляторов транскрипции. Алгоритм BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) позволил выявить в регуляторной области гена *gseBi* потенциальные сайты для взаимодействия с белками DegU (система трансдукции сигнала DegS-DegU), Spo0A (инициация спорообразования), белком катаболитной репрессии CsrA и глобальным регулятором метаболизма AbrB. Эти участки в промоторе расположены в виде прямых tandemных повторов. Делецией в области регуляции получены два модифицированных гена *gseBi* с различной длиной промотора: протяжённостью 364 н.о., утративший потенциальные сайты связывания с регуляторными белками DegU, Spo0A, CsrA и длиной 187 н.о. с исключёнными сайтами DegU, Spo0A, CsrA, AbrB. Для этого, с матрицы плазмиды Δ58.21 были амплифицированы последовательности нуклеотидов, включающие регуляторную область гена *gseBi*. Продукты амплификации клонировали в репликационный вектор pUC19, а затем в вектор pUP110, реплицирующийся в клетках бацилл. Полученными конструкциями трансформировали лабораторный штамм *B.subtilis*, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Изучена динамика роста и экспрессия гена фермента в условиях солевого стресса и в присутствии глюкозы. Отсутствие функционально активных сайтов для белков DegU и Spo0A приводит к снижению уровня экспрессии гена *gseBi* практически в 7 раз и изменениям в динамике накопления фермента. Уровень экспрессии модифицированных генов в присутствии солей понижался по сравнению с контролем. Показано, что экспрессия гена глутамилэндопептидазы, имеющего длину промотора 364 н.о., повышается по сравнению с контролем при добавлении в среду 1% глюкозы. По всей видимости, в результате уменьшения длины промотора инактивированы те последовательности, которые ответственны за взаимодействие с белком CsrA и полученные конструкции нечувствительны к катаболитной репрессии.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00789-а.

Исследование образования олигомерных комплексов трансмембранным доменом BNIP3 в мицеллах детергентов

Ульянова Екатерина Михайловна*^{1,2}, Артеменко Елена Олеговна², Егорова Наталья Станиславовна², Арсеньев Александр Сергеевич², Феофанов Алексей Валерьевич^{1,2}

* студент

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

E-mail: catty2001@rambler.ru

BNIP3 – уникальный митохондриальный белок, способный инициировать особый тип клеточной гибели, который имеет ряд признаков как апоптоза, так и некроза [1]. Трансмембранный домен BNIP3 (TM-BNIP3) важен для функциональной активности белка [1] и участвует в его гомодимеризации, роль которой невыяснена [2]. Мы изучили особенности олигомеризации TM-BNIP3 в мицеллах додецилсульфата натрия (ДСН) и додецилфосфохолина (ДФХ), которые были использованы как модельные мембраноподобные системы.

Пептид, соответствующий TM-BNIP3, получали твердофазным синтезом. Присоединение флуоресцентных меток, образующих донор-акцепторную пару, по N-концевой аминокислотной группе пептида позволило использовать эффект резонансного переноса энергии флуоресценции (РПЭФ) для исследования олигомеризации TM-BNIP3. С помощью спектроскопии кругового дихроизма нами показано, что TM-BNIP3 и его флуоресцентно-меченные производные встраиваются в мицеллы детергентов и принимают нативную α -спиральную конформацию. Используя методику электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, установлено, что TM-BNIP3 способен к самоассоциации в мицеллах ДСН, и присоединение флуоресцентных меток не повлияло на его способность олигомеризоваться. Методом РПЭФ подтверждено, что TM-BNIP3 образует олигомерные комплексы в мицеллах ДСН и ДФХ, исследована кинетика образования комплексов и измерены наблюдаемые константы диссоциации комплексов при различных концентрациях детергентов.

Сравнительный анализ полученных нами значений констант диссоциации комплекса TM-BNIP3 в мицеллах ДСН с константами диссоциации комплекса, образуемого TM фрагментом гликофорина А [3], показывает, что TM-BNIP3 обладает более высокой способностью к самоассоциации. Наши данные предполагают, что TM-BNIP3 вносит существенный вклад в стабилизацию димеров BNIP3. Дальнейшее изучение особенностей олигомеризации TM-BNIP3 будет способствовать лучшему пониманию закономерностей, лежащих в основе спираль-спиральных взаимодействий TM доменов мембранных белков, и, вероятно, позволит объяснить роль самоассоциации в функциональной активности BNIP3.

Литература

1. Mellor H.R., Harris A.L. (2007) The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer // *Cancer Metastasis Rev.*, v. 26, p. 553-566.
2. Sulistijo E.S., Jaszewski T.M., MacKenzie K.R. (2003) Sequence-specific dimerization of the transmembrane domain of the "BH3-only" protein BNIP3 in membranes and detergent // *J. Biol. Chem.*, v.278, p. 51950-51956.
3. Fisher L.E., Engelman D.M., Sturgis J.N. (1999) Detergents modulate dimerization, but not helicity, of the glycoporphin A transmembrane domain // *J. Mol. Biol.*, v. 293, p. 639-651.

Постнатальный гистогенез интерренальной и хромаффинной ткани надпочечника свиней: динамика клеточного состава

Федотов Дмитрий Николаевич

Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь

E-mail: fedotovdima@mail.ru

Видовая, сравнительная, возрастная и функциональная морфология эндокринных желез, в том числе и надпочечников (адреналовая или надпочечная железа) многих млекопитающих в настоящее время остается практически без внимания. Современной морфологической науке необходимо обладать и располагать этими данными, так как, не зная теоретической основы морфофункциональных аспектов эндокринных желез, мы не можем говорить о практике, ведь она без теории не будет осуществляться в нужном направлении [1].

Материал (надпочечники) отбирался от свиней в периоды новорожденности, отъема, дорастивания, полового и физиологического созревания, хозяйственного использования и геронтологии. Надпочечную железу брали целиком, фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Надпочечная железа новорожденных поросят характеризуются наличием тех же зон, что и у взрослых свиней. В корковой паренхиме надпочечников новорожденных обнаруживаются признаки секреции стероидных гормонов. В процессе роста организма происходит увеличение массы органа, расширяются зоны коры надпочечника. С возрастом происходит увеличение как коркового, так и мозгового вещества. Мозговое вещество у 1-суточных поросят составляет около 25 % общей массы надпочечника. Оно характеризуется ячеистой структурой. Хромаффинные элементы представлены А- и Н-клетками, расположенными группами. А-клетки располагаются по периферии, Н-клетки – в центральной части медуллы. Медулла в первый месяц постнатального развития поросят характеризуется минимальным значением абсолютной толщины. У свиней в период полового созревания наблюдается увеличение толщины мозгового вещества, диаметра А- и Н-клеток и объема их ядер по сравнению с предыдущими периодами. Соотношение А- и Н-клеток в надпочечнике свиньи зависит от видоспецифичности и возраста. В структуре надпочечных желез по мере старения уменьшается упорядоченность в расположении клеток, наблюдается большая вариабельность размеров клеток и их ядер, снижается общее число клеток и их размеры. Абсолютная толщина коркового слоя минимальна у новорожденных ($920,5 \pm 30,86$ мкм), она резко возрастает у поросят-отъемышей ($1180,0 \pm 19,49$ мкм), незначительно увеличивается к 4-месяцам (период дорастивания). У взрослых свиней достоверно увеличиваются размеры коры в сравнении с молодняком. В 7-месячном возрасте (период полового созревания) толщина коркового вещества максимальна из всех возрастных периодов и составляет $1550,7 \pm 82,33$ мкм. С возрастом у свиней отмечается увеличение размеров мозгового вещества. Его толщина минимальна у новорожденных ($400,5 \pm 16,55$ мкм), она возрастает у 30-суточных поросят ($710,0 \pm 20,50$ мкм), заметно увеличивается к половому созреванию свиней ($1550,9 \pm 92,03$ мкм) и после завершения полового созревания дальнейшее изменение описываемого показателя наблюдается в виде плавного его уменьшения у взрослых и старых свиней. Достоверных различий в гистостроении левого и правого надпочечников в постнатальном развитии свиней нами не обнаружено.

Литература

1. Сапин М.Р. (2000) Сегодня и завтра морфологической науки // Морфология, № 3, том 117, с. 6 – 8.

Некоторые ферменты гликолиза как субстраты шаперонина TRiC. Выделение и исследование термодинамических параметров TRiC.

Федюнин Иван Александрович

студент

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: i_fedunin@mail.ru

Шаперонин TRiC (TCP-1 Ring Complex), так же известный как CCT (Cytosolic Chaperonin containing TCP-1), - большой мультисубъединичный белковый комплекс, опосредующий фолдинг белков в цитоплазме эукариотических клеток. Известно, что TRiC осуществляет сворачивание определенных белков, таких как актин, тубулин, нейрофиламент и некоторых других, но спектр его субстратов до сих пор остается определенным лишь частично. Известна возможность шаперонина предотвращать некоторые случаи агрегации, но возможность TRiC препятствовать термоагрегации белков неизвестна.

С помощью анализа известных методик получения TRiC был разработан простой метод выделения данного шаперонина из семенников барана. Данная методика позволяет выделить шаперонин всего в три стадии: высаливание сульфатом аммония, ультрацентрифугирование и хроматография на гепарин-сефарозе. С помощью SDS-электрофореза и определения размеров частиц методом динамического лазерного светорассеяния ("Zetasizer Nano-ZS", Malvern, U.K.) было показано, что выделенный препарат гомогенный, и молекулярный вес субъединиц соответствует данным в литературе. Также был проведен масс-спектрометрический анализ аминокислотного состава выделенного белка, в результате которого было идентифицировано 7 (из 8 разных) субъединиц TRiC. Полученный препарат шаперонина TRiC инкубировали в присутствии денатурированной мономерной формы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), иммобилизованной на сефарозе 4В. После анализа проб при помощи SDS-электрофореза было показано, что TRiC связывается с ГАФД, денатурированной в присутствии 4М гуанидингидрохлорида. Однако при проведении реактивации денатурированных форм ГАФД и лактатдегидрогеназы, шаперонин-зависимая реактивация была возможна только в случае последнего фермента. В данной работе также изучалось влияние TRiC на термоагрегацию ГАФД и способность шаперонина к образованию комплексов с термоденатурированными формами фермента. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) было показано, что при нагревании TRiC в присутствии ГАФД не наблюдаются изменения кривой теплопоглощения, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между исследуемыми белками в данных условиях. Кроме того был проведен анализ влияния шаперонина на тепловую агрегацию ГАФД. Как и в случае ДСК, было продемонстрировано отсутствие связывания и «защиты» ГАФД от термоагрегации.

Таким образом, данная работа проливает свет на такие общие характеристики малоизученного шаперонина TRiC, как субстратная специфичность и влияние на процессы агрегации.

Работа была поддержана грантами РФФИ (грант № 05-04-48955-а и № 06-04-48240-а) и NATO (PDD (СР)-(СВР.NR.RIG 982779)).

Автор выражает признательность к.б.н. И.Н. Налетовой за помощь в подготовке тезисов.

Исследование параметров иммобилизации инулиназы на синтетических полиэлектролитах

Холявка Марина Геннадьевна

аспирант

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E-mail: Holyavka@rambler.ru

Инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) расщепляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры растительного происхождения до фруктозы, которая широко используется в кондитерской промышленности, а также для профилактики сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Объектом наших исследований является инулиназа из дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-303. Особенности культивирования продуцента, протокол очистки, методы определения активности фермента, подготовки ионитов и иммобилизации энзима представлены в [1].

Показано, что АВ-17-2П является наиболее перспективным из исследуемых нами носителей для иммобилизации инулиназы. При адсорбции на данном полиэлектролите препарат сохранял 75,5% первоначальной каталитической способности. При связывании с ионитами КУ-2, ВИОН КН-1, АВ-16-ГС и АМ 21А оставалось соответственно 61,7%, 27,5%, 17,8% и 14,5% ферментативной активности. По нашим данным, оптимальное значение рН для свободного энзима составляет 4,7 единиц, при иммобилизации на исследуемых полиэлектролитах оптимум рН практически не изменяется. Температурный оптимум для иммобилизованной на всех пяти носителях инулиназы смещается в сторону более высоких значений с максимальной активностью при 70°C, что на 20°C выше, чем для нативного фермента. Можно предположить, что адсорбция на матрице различных носителей стабилизирует молекулу инулиназы, защищая ее от воздействия экстремальных значений рН, температуры, а также других денатурирующих агентов за счет уменьшения степени мобильности пространственной структуры, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса [2]. Сравнительный анализ значений основных кинетических параметров реакций гидролиза инулина иммобилизованными препаратами позволяют нам заключить, что наибольшую степень сродства к субстрату проявляет инулиназа, адсорбированная на макропористой анионообменной смоле АВ-17-2П. Очевидно, фермент достаточно прочно связывается с матрицей данного носителя, существенно не изменяя при этом своей каталитически активной конформации. Выше перечисленное позволяет считать синтетический полиэлектролит АВ-17-2П перспективным для дальнейших исследований с целью разработки стабильных и высокоактивных гетерогенных биокатализаторов, позволяющих упростить и удешевить процесс получения фруктозы из растительного сырья.

Литература

1. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С.//Биотехнология. - 2007. - 3 - 80-87.
2. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Таха А.С.//Сорбционные и хроматографические процессы. - 2007. - 7, 5. - 804-810.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Ковалевой Т.А. за помощь в подготовке тезисов

Действие регулятора роста циркон для снижения токсического действия тяжелых металлов на примере яровой пшеницы

Чурсина Е.В.

аспирант

Всероссийский научно-исследовательский институт агрохимии

имени Д.Н. Прянишникова

E-mail: janeacad@mail.ru

Следствием нарастающей техногенной нагрузки на биосферу является повышение концентраций в почве и сельскохозяйственной продукции ряда химических элементов, в большинстве случаев извлекаемых из земных недр, интенсивно используемых и рассеиваемых в природной среде – тяжелых металлов. Внедрение в практику в середине прошлого века регуляторов роста, применяемых в качестве средств защиты и повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам. В то же время, сведений о влиянии регуляторов роста на снижение негативного действия токсических металлов на растение в литературе очень мало. Проводились исследования по изучению возможности применения циркона для снижения негативного действия тяжелых металлов (кадмия) на рост, развитие и продуктивность сельскохозяйственных культур [2]. Из проведенных опытов выявлена возможность применения предпосевной обработки семян регулятором роста циркон для снижения негативного действия кадмия. Получено, что использование циркона снизило ингибирующее действие этого элемента на формирование ассимиляционной поверхности, улучшило условия закладки элементов продуктивности и увеличило урожай зерна [2]. Так же проводились исследования по использованию циркона для снижения токсического действия цинка на примете яровой пшеницы. Выявлено, что опрыскивание регулятора роста циркон способствует достоверному снижению токсического действия цинка на растения пшеницы [3]. В связи с этим целью наших исследований явилось изучение возможности применения регулятора роста для снижения негативного действия тяжелых металлов (кадмия, цинка и свинца) на продуктивность яровой пшеницы сорта Мис. В нашем опыте установлено, что при комплексном внесении кадмия, свинца и цинка в почву, происходит снижение продуктивности растений яровой пшеницы. Получено достоверное снижение массы зерна в 1,7 раза по сравнению с контролем без внесения тяжелых металлов в почву. Резкое уменьшение продуктивности растений явилось результатом токсического действия тяжелых металлов на формирование репродуктивных органов. Опрыскивание вегетирующих растений цирконом, как и в предыдущих исследованиях, повлияло стабилизирующим образом на продуктивность растений яровой пшеницы. Выявлено, что масса зерна увеличилась на 30 % при внесении тяжелых металлов в почву и с обработкой растений регулятором роста. Таким образом, можно сделать вывод, что применение Циркона способствовало достоверному снижению токсического действия тяжелых металлов (кадмия, цинка и свинца) на растения яровой пшеницы сорта Мис.

Литература

1. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в системе почва-растение. Новосибирск: Наука, СО, 1991. 151 с.
2. Серегина И. И. Возможность применения регуляторов роста для снижения негативного действия кадмия на рост, развитие и продуктивность яровой пшеницы // Агрохимия. 2004, №1, С. 71 —74.
3. Серегина И. И. Чурсина Е.В. Использование Циркона для снижения токсического действия цинка на растения пшеницы // Доклады ТСХА. 2006. Вып. 278. – М. С. 561-565.

Действие сфинголипида сфингозина на квантовую секрецию медиатора в нервно-мышечных синапсах теплокровных

Шакирзянова Анастасия Вячеславовна¹, Валеева Гузель Равиловна²

1 – младший научный сотрудник, к.б.н., 2 – студентка

1 – Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия; 2 – Казанский государственный университет, Казань, Россия

E-mail: nastyas@mail.ru

Известно, что аминоспирт сфингозин, один из компонентов сфинголипидов, обладает рядом важных биохимических свойств в организме. Так, он является ингибитором протеинкиназы С, активирует некоторые другие киназы и оказывает регуляторное влияние на целый спектр ферментов, поэтому, в настоящее время полагают, что он является вторичным посредником. Наряду с другими интересными качествами, сфингозин способен ингибировать аффинные свойства мускариновых рецепторов, а также увеличивать образование перекиси водорода клетке. Задачей нашей работы было исследовать способность сфингозина регулировать процесс квантовой секреции ацетилхолина (АХ) из нервных окончаний позвоночных.

Эксперименты проводились на нервно-мышечных препаратах диафрагмы мышцы с использованием стандартной микроэлектродной техники. Исследуемые агенты подавались к мышце с системой перфузии, в экспериментах с аппликацией сахарозы применяли систему локальной аппликации непосредственно к синаптической области.

Нами было показано, что сфингозин облегчает спонтанную секрецию АХ в нервно-мышечном синапсе мышцы. Так, частота миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) увеличивалась под действием сфингозина на $30,3 \pm 8,5\%$ от контрольных значений ($n=12$; $P<0.05$). Кроме того, сфингозин усиливал спонтанную секрецию при локальной аппликации сахарозы (60 мМ, 1-2 мин) (на $40,7 \pm 10,1\%$ от частоты МПКП при аппликации сахарозы в контроле). Эти данные предполагают, что сфингозин увеличивает аффинность белков экзоцитоза к внутриклеточному кальцию. Амплитуда МПКП при действии сфингозина не изменялась, что говорит об отсутствии постсинаптических эффектов этого аминоспирта в нервно-мышечных синапсах позвоночных.

Ингибитор сфингозина MAPK (20 μ М) напротив, достоверно снижал частоту МПКП в покое ($83,6 \pm 3,6\%$ от частоты МПКП в контроле) и при локальной аппликации сахарозы (до $82,3 \pm 7,1\%$ от частоты МПКП при аппликации сахарозы в контроле), что говорит о тоническом облегчающем действии эндогенного сфингозина на спонтанную секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний млекопитающих.

Таким образом, результаты нашей работы показали, что сфинголипид сфингозин оказывает облегчающее действие на интенсивность квантовой секреции АХ из нервных окончаний млекопитающих, причем его эффект может быть связан с изменением чувствительности SNARE комплекса экзоцитоза к цитоплазматическому кальцию.

Работа поддержана грантами РФФИ, Президента РФ, Фондом содействия отечественной науке, МинОбрНауки и CRDF.

Применение новой технологии нанесения гербицидов на семена культуры риса при их предпосевной обработке

Шарипов Музаффар Джахангирович

Руководитель проекта

Узбекский научно-исследовательский институт защиты растений, ООО «Бионанотех»,

Ташкент, Узбекистан

E-mail: lametash@bcc.com.uz

Анализ результатов исследований многочисленных авторов свидетельствует о возрастающем интересе использования полимерных систем при обработке семян различных сельскохозяйственных культур. При этом отмечается высокая эффективность разрабатываемых полимерных препаративных форм и их экологическая целесообразность [1,2]. В связи с возникшими и прогнозируемыми рисками техногенных воздействий на экосистемы определены тенденции развития технологий, в том числе в сельскохозяйственном производстве, уменьшающих или исключаящих их загрязнение разнообразными часто токсичными химическими средствами защиты растений. При этом применяются различные подходы к производству физиологически активных препаратов, способных в малых дозах обладать высокой эффективностью. Активно развиваются исследования по разработке и производству нетоксичных соединений, создаются технологии, исключаящие контакт человека со средствами защиты растений при их использовании. Применение в новой технологии послынного нанесения на поверхность семян при их предпосевной обработке биологически активных соединений, в состав которых входят регуляторы роста и развития, средства защиты растений, а в качестве их носителей – производные природных полисахаридов (хитина и целлюлозы) способствовало увеличению степени подавления сорной растительности на посевах культуры риса от 79,6 до 94,7% в зависимости от состава полимерных систем. Проведенные исследования показали улучшение биометрических показателей растений. В частности, длина главной метелки растений риса увеличилась на 11,7-21,8%, масса зерен в ней возросла на 29,5-38,8%, в боковой – на 95,0-145,0%, уменьшился показатель пустозерности метелок риса на 21,5-30,6% по сравнению с контролем (семена не обработаны). Полученные результаты коррелируют с данными по урожайности. Урожай зерна риса возрастал на 48,3-51,2% в зависимости от состава испытанных в полевых условиях полифункциональных полимерных систем. Использование технологии послынной обработки семян полимерными полифункциональными системами обеспечивает уменьшение норм расхода гербицидов и других биологически активных соединений, прикрепление их к поверхности семян и исключение осыпаемости, а также ограничивает контакты человека с гербицидами при их применении. Это достигается благодаря замене традиционных принятых в производственных условиях способов внесения гербицидов с помощью тракторной и авиаобработок посевов на технологию нанесения их поверхность семян при предпосевной подготовке.

Литература

1. Рашидова С.Ш., Воропаева Н.Л. (2006) Водорастворимые полимер-полимерные смеси Ташкент, ФАН: АН РУз, 194 с.
2. M.D. Sharipov, I.N. Ruban, N.L. Voropaeva (2007) Polymers use in technology of rice seeds preparation to sowing//On the Book: XV International Workshop Bioencapsulation, Vienna, P-06, 1-4.

Тезисы основаны на результатах исследований, проведенных в рамках грантов ФПФИ и ГНТП А-8-089. Автор выражает признательность к.б.н. Рубану И.Н., д.х.н. Воропаевой Н.Л., Юсупову К.М. за помощь в подготовке тезисов.

Влияние терагерцового излучения на тонкопленочный препарат ДНК**Юрковская Елена Сергеевна.***студент**Новосибирский Государственный Технический Университет, Институт Лазерной
Физики СО РАН, НГТУ, Новосибирск, Россия**E-mail: elena_y@ngs.ru*

Дезоксирибонуклеиновая кислота - высокополимерное природное соединение, содержащееся в ядрах клеток живых организмов. ДНК - носитель генетической информации. Также ДНК является достаточно хорошо изученным объектом в плане строения, конформационной подвижности и химической активности. Следует отметить также, что существует множество неразрушающих химических методов исследования ДНК. Цель работы – выявить эффект влияния терагерцового излучения на тонкопленочный препарат ДНК, оценить величину и направленность эффекта и подобрать наиболее оптимальные условия эксперимента по мощности и времени облучения для достижения максимального эффекта. Для проведения эксперимента использовалась высокополимерная ДНК из тимуса теленка. Источник излучения это субмиллиметровый лазер с оптической накачкой. Длина волны генерируемого излучения 81,5 мкм (мощность 10 мВт) и 261 мкм (мощность 20мВт). Навеска ДНК растворялась в бидистиллированной воде, Концентрация раствора 1мг на 1 мл, далее раствор наносился на подложку из плавленого кварца. Образец высушивался в потоке воздуха при комнатной температуре до образования пленки. Препарат облучался в течение 30, 60 и 90 минут. Контролем служила вторая кварцевая пластина с препаратом, которая, во время облучения экспериментального образца находилась рядом с лазером, но не подвергалась облучению. Для изучения оптических свойств мы использовали неразрушающий метод УФ спектроскопии. Регистрация спектров в области 190-330 нм производилась до и после облучения, с помощью двулучевого УФ спектрометра SHIMADZU UV-3101PC.

В результате экспериментов было установлено: общая форма спектров облученного и контрольного образца не изменилась; облученный образец ДНК имеет меньшую относительно контрольного образца оптическую плотность в области 250-300 нм (максимум ~ 280 нм) и несколько бóльшую в области 190-220 нм. Максимальный эффект наблюдался при облучении длительностью 60 минут.

Таким образом, полученные предварительные данные не исключают наличие изменений конформации молекулы ДНК, вызванных терагерцовым излучением.

Возможности регуляции психических и физиологических параметров человека с помощью потребления воды разной степени биогенности

Яценко Наталья Юрьевна, Каримов Дамир Ринатович

студент, студент

Карагандинская Государственная медицинская академия, Карагандинский Государственный Университет имени Е. А. Букетова, Караганда, Казахстан

E-mail: ntlk88@inbox.ru, zhanrulezzz@mail.ru

В рамках настоящего исследования была поставлена следующая цель: экспериментально изучить воздействие воды разной степени биогенности на психические и физиологические показатели человека, и разработаны следующие задачи: теоретический анализ свойств воды и влияния на нее сторонних факторов, биополя человека и его связи с эмоциональной сферой, а так же экспериментальная проверка выдвинутой гипотезы. Последняя была оформлена следующим образом: вода с разным уровнем биогенности способна изменять психические и физиологические показатели организма с разной интенсивностью в пределах нормы. Понятие «биогенность» в этом ключе означает способность воды влиять на качество жизни живого организма, обусловленная ее структурными параметрами и состоянием гидроплазмы. В качестве носителей разной степени биогенности использовалась вода бутилированная, святая, ревитализированная по методу проф. В.М. Инюшина. Для решения поставленных задач были предложены следующие методы: анкетирование (методика «Самочувствие. Активность. Настроение.» (САН) и биохимический (на глюкозу) и клинический (гемоглобин, эритроциты, СОЭ, цветной показатель) анализы периферической крови испытуемых). Регистрация настоящих параметров была выбрана с точки зрения их динамичности и наибольшей показательности для диагностики общей картины физиологического и психологического статуса. Однако после проведения эксперимента было решено для дальнейшего углубления эмпирических знаний по данному вопросу на более объемной выборке применять цветовой тест Люшера вместо методики САН, как более валидный для диагностики пролонгированных эмоциональных состояний. Была разработана следующая структура эксперимента. Сформировано три экспериментальные группы по 20 человек, равноценные в гендерном и возрастном аспектах: контрольная (1), употреблявшая родниковую бутилированную воду и две экспериментальные: употреблявшие ревитализированную воду по методу проф. В. М. Инюшина (2), святую воду из Свято-Введенского собора г. Караганды (3). Хронологическая структура эксперимента выглядела следующим образом: забор крови и проведение методики САН, однократное потребление 200 мл воды в соответствии с принадлежностью к экспериментальной группе. Причем ни один участник не был информирован о своей групповой принадлежности. Затем по прошествии 30 мин - времени, необходимого для всасывания воды в кровь из желудочно-кишечного тракта - повторный забор крови, однако, без проведения САН. После чего каждый участник эксперимента получил по пять литров воды и потреблял ее по мере надобности в течение одной недели. Данный период хронического эксперимента был выбран с точки зрения привязки ритмов жизнедеятельности к недельному периоду. По окончании экспериментального воздействия у всех испытуемых была снова взята кровь и проведен тест САН. Для обработки полученных результатов был использован следующий метод: расчет изменения показателей крови и психической активности, полученных в конце хронического эксперимента, в процентах от начальных показателей; а также расчет изменения показателей крови, полученных в конце острого эксперимента, в процентах от начальных показателей. Динамика по результатам острого эксперимента 1 группа: эритроциты (Er) -2,7%, гемоглобин (Hb) -0,32%, глюкоза (гл) 8,79%, скорость оседания

эритроцитов (СОЭ) 50%; 2 группа: Ег и Нб 0%, гл -4,23%, СОЭ 16,67%; 3 группа: Ег 4,3%, Нб 4,5%, гл -3,74%, СОЭ -3,7%. По результатам хронического эксперимента 1 группа: Ег -3,6%, Нб 5,06%, гл 5,49%, СОЭ 0%, самочувствие (С) -1,72%, активность (А) 1,04%, настроение (Н) 3,6%; 2 группа: Ег 13,28%, Нб 3,3%, гл 0%, СОЭ 45,83%, С -0,6%, А 17,83%, Н 6,21%; 3 группа: Ег 16,67%, Нб 8,99%, гл -2,14%, СОЭ -14,81%, С 10,48%, А 11,11%, Н 14,07%.