

## **ПОДСЕКЦИЯ «БИОФИЗИКА, БИОИНЖЕНЕРИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ»**

### **Получение пористых матриц для тканевой инженерии** *Акулина Елизавета Александровна, Жаркова Ирина Игоревна* *МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, akoolka@mail.ru*

Разработка каркасных систем для регенерации дефектов костной ткани является актуальной проблемой в биоинженерии. Получение устойчивых трехмерных структур поможет решить проблему роста клеток в объеме, чего сложно добиться при обычных условиях.

Мы разработали новую методику получения трехмерных матриц на основе поли-3-оксибутирата и его сополимеров и композитов. Этот материал обладает особыми свойствами, такими как, например, биосовместимость и биодegradация, что позволяет использовать его в качестве основы для культивирования клеток.

Методика основана на принципе выщелачивания — вымывание из системы одного из её компонентов, который является порообразователем, и формовании с использованием 3D-шаблона. В данном случае в качестве порообразователя используется сахарный песок и/или карбонат аммония. В качестве шаблона — пробирка типа эппендорф на 2 мл или чашка Петри. Полученный шаблон насыщается раствором полимера в хлороформе с концентрацией 60 мг/мл. После испарения растворителя, из структуры вымывается порообразователь дистиллированной водой. После высушивания получается трехмерный матрикс, пористость которого составляет 80 %, размер пор — 180–200 мкм. Полученные матрицы были исследованы на биосовместимость с использованием мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга крыс. Для оценки жизнеспособности клеток использовался стандартный метод ХТТ.

Было показано, что при длительной культивации наблюдается рост числа клеток как на 96-луночном планшете, так и на полученных матрицах, причем на планшете при образовании полного монослоя клеток рост прекращался, а на трехмерных конструкциях количество клеток продолжало увеличиваться. При сравнении с ростом клеток на изделиях из полилактида особых различий выявлено не было.

Было также проведено исследование на обратимую и необратимую адсорбцию белка. В качестве модельного белка был взят ФИТЦ-меченый альбумин. Полученные изображения на конфокальном микроскопе продемонстрировали, что белок равномерно распределяется и адсорбируется на матриксе, однако при отмывании додецилсульфатом натрия практически полностью десорбируется, что свидетельствует об обратимой адсорбции белка на матриксах.

Таким образом, разработанную технологию получения трехмерных пористых матриц из поли-3-оксибутирата, его сополимеров и композитов можно использовать в тканевой инженерии, например, для инженерии костной ткани.

### **Использование авторской программы цифрового анализа контрастно окрашенных клеток для оценки жизнеспособности каллусной культуры женьшеня японского (*Panax japonicus* (T.Nees) C.A.Mey., var. *repens*)**

*Балекин Андрей Юрьевич*

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва,  
aib46@rambler.ru*

Современные способы оценки жизнеспособности клеточных культур с помощью компьютерных программ существенно экономят время, исключая визуальный подсчёт живых

клеток исследователем. Для автоматизации трудоёмкого процесса учёта живых клеток в каллусных культурах был разработан оригинальный метод, основанный на регистрации клеток, окрашенных в контрастные цвета с помощью авторской компьютерной программы, использующей простой алгоритм. Каллус женьшеня японского (*Panax japonicus* (T.Nees) С.А.Меу., var. *repens*, коллекция Института физиологии растений РАН) сначала окрашивали хлоридом 2,3,5- трифенилтетразолия (ТТХ), который дегидрогеназами живых клетках восстанавливался до красного формазана. Процедуру окрашивания проводили в темноте при +37°C в течение 30 минут. Затем, каллус, окрашенный формазаном, обрабатывали синькой Эванса. Нежизнеспособные клетки с повреждённой плазмолеммой окрашивались в синий цвет. Из каллуса, последовательно обработанного ТТХ и синькой Эванса, готовили давлённый препарат на предметном стекле. С помощью микроскопа и цифровой фотокамеры Levenhuk ДСМ 510 фотографировали контрастно окрашенные препараты на темном фоне в формате bmp. Для цифрового анализа изображения контрастно окрашенных клеток использовали специальную, разработанную нами программу, которая распознавала цвет каждого пикселя цифровой фотографии и регистрировала размер областей с клетками, окрашенными в красный цвет - отдельно, а в синий цвет – отдельно. Темный фон цифровой фотографии программа автоматически исключала из расчётов. Таким образом, автоматизированный расчёт пиксельного размера красных и синих областей цифровой фотографии позволял вычислить процент живых и мёртвых клеток в препарате. Основным условием для работы с данным алгоритмом оказалось высокое качество цифровых фотографий препаратов контрастно окрашенных клеток. Экспериментально показано, что незначительные модификации использованной нами программы можно применять для автоматизированной оценки морфологических и физиологических особенностей клеток каллусных и других тканей и органов, а также суспензионных культур и культур соматических эмбрионов, если имеется в наличии цифровое изображение контрастно окрашенных клеток, органов или тканей. Для дополнительной оценки токсичности раствора ТТХ каллус, окрашенный формазаном, культивировали *in vitro*. Через две недели размер каллуса увеличился в 2–3 раза, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности клеток после ТТХ-теста.

Работа поддержана программой «Живая природа» президиума РАН.

### **Использование технологии децеллюляризации для создания искусственных органов и тканей**

***Боброва Мария Михайловна***

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, г.Москва, mariabobrova.msu@gmail.com*

Трансплантация печени - единственное доступное лечение тяжелой печеночной недостаточности, но в настоящее время существуют проблемы в этой области: острая нехватка органов для трансплантации, длительность ожидания операции, ее срочность, дороговизна, отторжение пересаженного органа. Эти проблемы может решить новый технологический подход создания трансплантатов на основе -децеллюляризованного органа.

Децеллюляризация- перспективный метод для приготовления трехмерного матрикса в тканевой инженерии, поскольку получающийся материал сохраняет специфическую архитектуру межклеточного матрикса оригинальной ткани, печеночную капсулу, включая функциональные и структурные аспекты нативного микроциркуляторного русла. Заселенный клетками матрикс поддерживает специфические функции печени. Для изучения свойств децеллюляризованной печени крысы была получена освобожденная от клеток печень путем перфузии с увеличивающимися концентрациями детергентов Triton X-100 и SDS.

Для децеллюляризации печени проводили перфузию органа через портальную вену растворами с различной концентрацией детергентов. Для выявления сосудистого русла матрикса проводили перфузию раствора красителя Dextran Blue. Была показана сохранность сосудистой сети. Анализ структуры печеночного матрикса методом гистологической окраски криосрезом показал, что сохранена трехмерная архитектура органа. Гистологическая оценка также показала отсутствие ядер или цитоплазматического окрашивания в матриксе. Механические свойства межклеточного матрикса, такие как прочность и эластичность, способны повлиять на морфологию клеток, их пролиферацию и дифференцировку. Поэтому было решено выяснить, как меняются механические свойства матрикса печени в зависимости от способа децеллюляризации и концентрации детергента. Таким образом, наиболее прочными на разрыв и эластичными при растяжении оказались образцы из печени, децеллюляризованной с раствором Triton 3%. Также проводили тест по оценке пролиферативной активности клеток на культуре клеток карциномы печени человека Hep-G<sub>2</sub> который показал, что наибольшую пролиферативную активность клетки проявили на матриксе из печени, децеллюляризованной с раствором Triton 3%.

Таким образом, децеллюляризация тканей и органов – перспективная технология, которая может стать основой для создания трехмерных материалов и изделий для тканевой инженерии и регенеративной медицины. При этом показано сохранение трехмерной архитектуры и структуры печеночного матрикса и сосудистой сети. Наиболее прочными на разрыв и эластичными при растяжении оказались образцы из печени, децеллюляризованной с раствором Triton 3%, что играет немаловажную роль для использования в трансплантологии. Возможности использования метода децеллюляризации очень велики: от создания тканей, сосудов, до целого органа с высоко специфическими функциями (печень, сердце, почка).

## **Получение мутантных генов с заменами C8S и C43S искусственного белка альбумина**

***Васильева Дарья Александровна***

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия; Институт биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия, vasilleva\_92@mail.ru*

Конструирование белков *de novo* с заданными структурными и функциональными свойствами позволит в будущем решать важнейшие задачи по разработке новых лекарственных средств белковой природы, получению препаратов для сельского хозяйства и биотехнологической индустрии. Первый искусственно созданный белок состоит из дважды повторенной структурной единицы  $\alpha\beta$ , в связи с чем он был назван альбумином (АВВ). Проблема сворачивания белка, а также процесс формирования неправильно свернутыми белками амилоидных фибрилл, вызывающих различные заболевания, являются одними из активно исследуемых в современной структурной биологии. Поскольку амилоиды различных белков обладают структурным сходством, общими чертами развития и токсичности, понимание механизма амилоидообразования на примере одного белка важно для общего понимания процесса амилоидогенеза. Предполагается, что в образовании амилоидных структур ключевую роль играют частично свёрнутые промежуточные состояния белка. Согласно ранним исследованиям АВВ изначально находится именно в таком состоянии.

Ранее была обнаружена способность АВВ к образованию амилоидных фибрилл, что позволило использовать его в качестве модельного белка для исследования механизмов фибриллогенеза. Кроме того, было показано, что наличие в последовательности АВВ двух остатков Cys способствует появлению в препарате белка ди- и тримеров. В связи с этим, нами

были предложены замены в аминокислотной последовательности АВВ остатков Cys на остатки Ser в 8-ом и 43-ем положениях. Для получения гена АВВ с указанными мутациями использовали методику направленного мутагенеза. Наличие двух совершенных повторов в последовательности гена АВВ затрудняет введение мутаций при помощи стандартной ПЦР. Поэтому в данном случае введение мутаций в ген АВВ проводилось в несколько этапов. Затем проводили электрофоретический анализ, выделяли полученные фрагменты ДНК, предположительно содержащие требуемые мутации, и нарабатывали с помощью ПЦР полноразмерные фрагменты. Далее осуществляли клонирование полученных мутантных фрагментов гена АВВ в плазмидный экспрессионный вектор рЕТ32-LIC и проверяли правильность введенных мутаций с помощью секвенирования. В данном плазмидном векторе ген АВВ экспрессируется в виде гибридного белка с тиоредоксином. Экспрессию гибридного белка осуществляли в клетках *E.coli* штамма BL-21(DE3). В настоящее время проводится оптимизация протокола выделения и очистки наработанного белка.

### **Применение квантовых точек для увеличения эффективности действия фотосенсибилизаторов**

***Гвоздев Даниил Александрович***

*МГУ имени М. В. Ломоносова, Россия, Москва, danil131054@mail.ru*

Антимикробная фотодинамическая терапия – относительно новый и весьма многообещающий метод инактивации патогенных микроорганизмов. В основе метода лежит способность некоторых соединений (фотосенсибилизаторов), нетоксичных в темноте, под действием света генерировать активные формы кислорода, осуществляющие деструктивное действие на клеточные структуры. Одними из наиболее популярных фотосенсибилизаторов в настоящее время являются фталоцианины цинка и алюминия. К сожалению, эти производные порфирина обладают довольно низкой поглощающей способностью в видимой области спектра, что ограничивает их потенцию к образованию активных форм кислорода. Мы предположили, что использование квантовых точек (КТ) как дополнительных светосборщиков может повысить эффективность действия фталоцианинов.

В нашей работе мы использовали квантовые точки с максимумом флуоресценции при 600 нм, положительно и отрицательно заряженные, а также поликатионные и полианионные фталоцианины цинка (ФЦ). Для изучения энергетического взаимодействия квантовых точек и фталоцианинов использовали методы оптической спектроскопии и метод счета фотонов в паре с пикосекундным лазером (405 нм). Было установлено, что квантовые точки и фталоцианины цинка в водном растворе за счет электростатических взаимодействий формируют гибридные комплексы. При этом интенсивность и время жизни флуоресценции квантовой точки сокращается, что свидетельствует о высокоэффективной миграции энергии с квантовой точки на фталоцианин цинка. В качестве описательной модели данного процесса использовали Ферстеровский резонансный перенос энергии. Полученные данные были использованы для расчета константы взаимодействия различных пар КТ-ФЦ и некоторых других параметров системы.

Для последующих опытов были отобраны пары КТ-ФЦ с высокими эффективностями миграции энергии. Генерация синглетного кислорода в парах КТ-ФЦ изучалась методом спиновых ловушек (электронный парамагнитный резонанс) и регистрацией изменения поглощения 1,3-дифенилизобензофурана. Для определения фотобактерицидной активности использовали бактериальную биолюминесцентную тест-систему «Эколном-08» на основе генно-инженерного штамма *E. coli* (pXen7). Показано, что деструктивное действие раствора

гибридных комплексов квантовых точек и фталоцианинов цинка выше, чем действие индивидуального раствора фталоцианина. Однако мы обнаружили, что раствор квантовых точек сам по себе обладает выраженной цитотоксической активностью.

Проведенные исследования показывают, что квантовые точки являются действительно перспективным средством для увеличения эффективности фотодинамического действия фталоцианинов цинка.

### **Пролонгированное высвобождение лизоцима из микрочастиц на основе сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем**

<sup>1,2</sup>*Иванова Элина Валерьевна, <sup>2</sup>Зернов А.Л.*

<sup>1</sup>*МГУ им. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;* <sup>2</sup>*Институт биохимии им А.Н. Баха РАН, Москва, Россия, eliza92@yandex.ru*

Полимерные микро- и наночастицы с инкапсулированными веществами различной природы являются современными фармацевтическими формами лекарственных препаратов и широко используются в тканевой инженерии. Их применение обеспечивает постепенное поступление лекарственных веществ в организм в течение длительного времени и резко снижает токсичность, оказываемую на органы и ткани. Поли-3-гидроксибутират (ПГБ) и его сополимеры, получаемые в нашей лаборатории биотехнологическим путем с помощью штамма *Azotobacter chroococcum* 7Б, используются для разработки широкого спектра изделий биомедицинского назначения, обладающих необходимыми для этого свойствами биodeградируемости и биосовместимости.

В данной работе были исследованы микрочастицы, загруженные модельным белком, полученные с использованием методики двухэтапного эмульгирования S/O/W. В качестве такого белка был выбран лизоцим, обладающий ферментативной активностью. Для инкапсулирования белка были использованы сополимер поли-3-гидроксибутират-полиэтиленгликоль (ПГБ-ПЭГ) молекулярной массы 150 кДа, а также гомополимеры ПГБ с молекулярной массой 25 и 150 кДа; гидроксиапатит; лизоцим. Высвобождение белка из микрочастиц осуществлялось *in vitro* в фосфатном буфере (рН 7,4) при 37° С.

Морфология полученных микрочастиц изучалась с помощью методов электронной и конфокальной микроскопии. Был установлен диаметр микрочастиц (41±12 мкм) и показано, что частицы имеют поверхность с большим количеством пор. Также доказано включение композита белка с гидроксиапатитом в полимерный матрикс и выявлено его распределение внутри микрочастиц.

Высвобождение белка из микрочастиц происходит посредством двух процессов: диффузии и деградации микрочастиц. На кинетику высвобождения белка оказывают влияние молекулярная масса и гидрофобность полимера. Для улучшения характеристик пролонгированного высвобождения лизоцима нами был использован менее гидрофобный ПГБ-ПЭГ, а так же ПГБ разных молекулярных масс для сравнения. В результате, по характеру высвобождения частицы из ПГБ-ПЭГ превзошли микрочастицы из ПГБ, кроме того, по эффективности инкапсулирования белка данный сополимер также имел преимущества.

Однако белок, инкапсулированный в полимерный матрикс, в процессе высвобождения может разрушаться. Чтобы убедиться в его целостности, был проведен электрофорез высвободившегося белка по Леммли и исследование ферментативной активности лизоцима. Было показано, что лизоцим сохранял ферментативную активность на высоком уровне в течение длительного времени высвобождения *in vitro* в фосфатном буфере (рН 7,4) при 37° С.

Были проведены опыты на биосовместимость *in vitro*, показавшие, что данные микрочастицы не оказывают на клетки сильного угнетающего действия, а наилучшей биосовместимостью обладают микрочастицы из полимера ПГБ-ПЭГ. Исследования полученных микрочастиц на биосовместимость *in vivo*, проводимые на крысах линии Wistar, показали, что выраженной воспалительной реакции, некроза, нагноения не наблюдается на всех сроках, а вокруг имплантированных микрочастиц образуется соединительнотканная капсула.

Таким образом, были получены микрочастицы из трех полимеров, способные к пролонгированному высвобождению белков. Показано, что наилучшими параметрами инкапсулирования и высвобождения обладают микрочастицы из ПГБ-ПЭГ, а лизоцим при выходе из частиц не теряет своей целостности и ферментативной активности в течение длительного времени. Проведенные опыты на биосовместимость *in vitro* и *in vivo* показали возможность использования данных биомедицинских изделий в тканевой инженерии.

### **Противоопухолевая активность *in vivo* новых наноразмерных композитов на основе доксорубина**

<sup>1</sup>Казарян Шушаник Арменовна, <sup>2</sup>Бабаян Н.С., <sup>2</sup>Григорян Р.М., <sup>2</sup>Саркисян Н.К.,  
<sup>3</sup>Аракелова Е.Р.

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Российско-Армянский (Славянский) Университет; <sup>2</sup>Институт молекулярной биологии НАН РА; <sup>3</sup>Ереванский государственный политехнический университет, Республика Армения, г. Ереван, shushu-90@mail.ru

На сегодняшний день нанотехнологии предоставляют широкие возможности в лечении опухолевых заболеваний, которое направлено на избирательное разрушение опухолевых клеток. В процессе разработки наноносителей для лекарственных средств полимеры полиэтиленгликоль (PEG) или полиэтиленоксид (PEO) и крахмал (Starch) занимают одну из центральных позиций, благодаря двум важнейшим качествам- это биосовместимость и биодegradация. Активно исследуются также цинкоксидные (ZnO) наночастицы, однако существует ряд трудностей, связанных с получением сложных структур с необходимыми качествами. В данной работе представлены результаты исследований противоопухолевой активности *in vitro* новых наноразмерных ZnO композитов противоопухолевого препарата Доксорубин в виде полимерных (PEO, Starch) гидрогелей.

Противоопухолевую активность препаратов определяли на основе сравнительной цитотоксичности (индекс специфичности: ИС) по отношению к нормальным (клеточная линия MRC5) и опухолевым (клеточная линия HeLa) клеткам человека. Цитотоксичность определяли колориметрическим методом МТТ. Выживаемость клеток определяли на основе значений IC50 (концентрация ингибитора, при которой выживаемость клеток равно 50%). Механизм цитотоксической активности исследовали с помощью проточной цитометрии на основе анализа задержки клеточного цикла. Для статистической обработки данных использовали t-тест Стьюдента.

Было показано, что добавление ZnO в структуры композитов Starch + NaCMC + Dox и PEO (gel) + Dox повышает ИС по отношению к опухолевым клеткам. Сравнительный анализ показал, что PEO (gel) + Dox + ZnO (ИС >> 200) имеет более высокую селективную цитотоксичную активность против опухолевых клеток (более 4 раз), чем Starch + NaCMC + Dox + ZnO (ИС >> 4) и чистый DOX (ИС = 56). Анализ распределения клеток в клеточном цикле показал, что после воздействия PEO (gel) + Dox + ZnO значительно увеличилось количество клеток в S-фазе. Таким образом, значительно низкие величины IC50 PEO (gel) +

Dox + ZnO определенные для раковых клеток и арест клеток в S-фазе могут быть связаны с повышением клеточного поглощения, что вызывает ингибирование биосинтеза ДНК.

Таким образом, результаты исследований противоопухолевой активности PEO(gel)+Dox+ZnO *in vitro* свидетельствуют о высоком потенциале наноразмерных ZnO композитов в виде полимерных гидрогелей для использования в противоопухолевой терапии.

### **Исследование переноса энергии возбуждения в гибридных системах из CdSe/ZnS квантовых точек и фикобилипротеинов**

***Карпулевич Анастасия Андреевна***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, каф. биофизики биологического факультета, Россия, Москва, 119992, tesoromia@mail.ru*

В последнее время ведется работа по созданию гибридных фотопреобразователей на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов (ПБК). Расчеты показывают, что КПД подобных устройств может превышать КПД современных солнечных батарей, однако малая поглощающая способность выделенных реакционных центров снижает эффективность таких устройств. Для увеличения эффективного сечения поглощения нативных ПБК могут быть использованы синтетические полупроводниковые нанокристаллы – квантовые точки (КТ), которые обладают высокими коэффициентами экстинкции в ультрафиолетовом и видимом диапазонах спектра, а значения квантовых выходов флуоресценции достигают 0.7.

В качестве модельной системы для исследования механизмов взаимодействия КТ и нативных ПБК были выбраны 5 типов CdSe/ZnS КТ с максимумами флуоресценции в диапазоне от 545 до 642 нм, водорастворимых за счет функциональных оболочек с карбоксильными группами, которые титровали растворами фикобилипротеинов, выделенных из цианобактерий *Arthrospira maxima*. Исследование проводилось с помощью методов спектроскопии высокого временного разрешения, основанная на системе однофотонного счета SimpleTau-130 (Becker & Nickl, Германия).

Установлено, что в гибридных системах миграция энергии между КТ и фикобилипротеинами может осуществляться безызлучательно, по механизму Ферстера. Миграция энергии наблюдалась во всех пяти исследованных гибридных системах. По мере увеличения концентрации белка наблюдали тушение (сокращение времени жизни и снижение интенсивности) флуоресценции КТ (донор энергии) и увеличение интенсивности флуоресценции фикобилипротеинов (акцептор). Для квантовых точек с максимумом флуоресценции 642 нм наблюдали частичное перекрытие спектра флуоресценции белка и спектра поглощения квантовых точек. Для всех типов КТ были рассчитаны интегралы перекрытия и соответствующие радиусы Ферстера. По расчетам, эффективность миграции энергии достигала от 20% до 70%. Наиболее эффективный перенос энергии был получен для квантовых точек с максимумом флуоресценции 622 нм. Наименее эффективный перенос энергии наблюдали для квантовых точек с максимумом флуоресценции 545 нм. Таким образом, эффективность миграции энергии в гибридных системах зависит от величины интеграла перекрытия спектра флуоресценции донора и спектра поглощения акцептора. Установлено, что квантовые точки позволяют увеличить эффективное сечение поглощения фикобилипротеинов. Полученные результаты исследования модельных систем могут быть использованы при создании гибридных преобразователей энергии на основе фотосинтетических ПБК.

## **Спектроскопическое измерение энергии взаимодействия в нуклеотид- актиномициновых наноконплексах**

***Ковалев Владимир Игоревич***

*Институт биофизики клетки РАН, Московская область, город Пущино,  
kovalev@chemist.com*

Для улучшения проникновения гетероциклических антибиотиков, в частности, актиномицина в клетку можно использовать различные молекулы-переносчики. В качестве молекул-переносчиков могут быть использованы агрегаты пуриновых оснований (гуанина, аденина) кластеры кофеина, фрагментированная ДНК. Ряд авторов изучал подобные комплексы с помощью ЯМР и рентгеноструктурного анализа в модельных (не терапевтических) условиях при очень высокой концентрации антибиотика. В лаборатории ИБК РАН с помощью флуоресцентного производного 7-аминоактиномицина удалось изучить комплексы при физиологических (низких) концентрациях антибиотика. Также с помощью предложенного флуоресцентного метода удалось определить энергию взаимодействия 7-аминоактиномицина с потенциальными молекулами-переносчиками. В случае пуриновых оснований (гуанин, аденин) и кофеина энергия взаимодействия достигала 7 ккал/моль, что мало отличалось от случая с фрагментированной ДНК (7,7 ккал/моль). Это означает, что взаимодействие антибиотика происходит преимущественно с пуриновыми основаниями ДНК, а дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты вносят в энергию взаимодействия очень малый вклад. С помощью спектров излучения продемонстрировано, при фотовозбуждении антибиотик может высвобождаться из кластеров в водную фазу. Однако, при фотовозбуждении антибиотик не выходит из фрагментированной ДНК. Это означает, что взаимодействие антибиотика с ДНК определяется не столько энтальпийной составляющей (почти одинаковой и в случае агрегатов пуриновых оснований и кластеров кофеина), сколько энтропийной составляющей, т.е. стерическим фактором – нахождением антибиотика в гидрофобной области расплетённых участков ДНК. Предложенный подход нахождения энергии взаимодействия может применяться для самых разных биоструктур, где используются флуоресцентные зонды.

*Работа поддержана грантом Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине – 2014». Автор благодарит А.В. Браславского (Тайвань) за финансовую помощь и Н.Л. Векшина за поддержку исследований.*

## **Изменение способности гемоглобина переносить O<sub>2</sub> и NO при активации пуринорецепторов эритроцитов**

***Коваленко Светлана Сергеевна***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, РФ, г. Москва, biochem\_mordovia@mail.ru*

Известно, что аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) обеспечивает нормальное функционирование клеток. Кроме того, она является основным лигандом для пуриноэнергических рецепторов (ПР) большинства клеток крови. При этом, действие активации ПР эритроцитов на состояние гемоглобина практически не изучено.

Материалом исследования служили эритроциты как в цельной крови здоровых доноров, так и отделенные от плазмы путем трехкратного центрифугирования. Конформацию гемопорфирина и содержание комплексов гемоглобина с O<sub>2</sub> и NO изучали методом спектроскопии комбинационного рассеяния ( $\lambda=473$  нм,  $\sim 20$  мВт), анализируя интенсивности полос КР-спектров. Изменение микровязкости мембран эритроцитов регистрировали с помощью электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР), используя в качестве зонда 16-доксилстеариновую кислоту. Микрорельеф плазматической мембраны эритроцитов



исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). При сравнении параметров в контрольных и опытных образцах применялся непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считались изменения при  $p < 0,05$ .

Установлено, что при инкубации выделенных эритроцитов с АТФ в течение 15 и 25 минут содержание оксигемоглобина возрастает дозозависимо. При активации ПР эритроцитов в цельной крови наблюдается тенденция к увеличению числа комплексов гемоглобина с  $O_2$ . На 15 минуте инкубации суспензии эритроцитов с АТФ количество комплексов гемоглобина с  $NO$  возрастает, а для эритроцитов в плазме крови - не изменяется. Достоверное увеличение способности связывать и отдавать кислород зарегистрировано на 25 минуте инкубации эритроцитов с микромолярными концентрациями АТФ. В цельной крови аналогичные эффекты наблюдаются только при миллимолярных концентрациях АТФ на 5 минуте инкубации.

Мы предполагаем, что активация ПР эритроцитов, характеризующаяся входом в клетку  $Ca^{2+}$ , а также активацией внутриклеточных ферментов, может оказывать опосредованное влияние на цитоплазматический скелет эритроцита. Нами было выявлено, что микровязкость гидрофобной области плазматической мембраны увеличивается при 15-минутном действии 100 мкМ и 5 мМ АТФ. Обнаружено уменьшение шероховатости мембраны эритроцитов как в цельной крови, так и у выделенных клеток при добавлении миллимолярных концентраций АТФ. При конечной концентрации АТФ 100 мкМ в суспензии эритроцитов наблюдалось увеличение данного показателя.

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение конформации молекулы гемоглобина и способности эритроцитов переносить  $O_2$  и  $NO$  при определенных концентрациях экстраклеточного АТФ могут быть обусловлены активацией ПР. Изменение ионного баланса клетки и усиление активности АТФаз, киназ, фосфотаз, сопровождающие активацию ПР эритроцитов, могут вызывать конформационные изменения цитоскелета эритроцитов, увеличивать вязкость мембраны и формировать новый микрорельеф поверхности. Кроме того, мы предполагаем, что активация ПР эритроцитов в цельной крови, в отличие от суспензии эритроцитов, контролируется ферментами плазмы, а также другими клетками, обладающим ПР.

### **Изучение адгезии и пролиферации эмбриональных фибробластов мыши на композитных матриксах на основе фиброина и желатина**

*Котлярова Мария Сергеевна*

*МГУ имени Ломоносова, Россия, Москва, kotlyarova.ms@gmail.com*

Нехватка донорского материала является одной из актуальных проблем современной регенеративной медицины. В связи с этим, существует необходимость в разработке биоискусственных тканей и органов для заместительной терапии. Один из подходов к созданию таких тканеинженерных конструкций заключается в изготовлении биосовместимых трехмерных носителей, используемых для культивирования аутологичных клеток донора, и последующей трансплантации клеточных имплантатов в организм.

Методом замораживания-оттаивания были изготовлены трехмерные композитные матриксы на основе фиброина шелка *Bombyx mori*, содержащие от 10% до 50% желатина. Способность материалов матриксов к поддержанию адгезии и пролиферации эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) исследовали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ).

Все полученные образцы поддерживали заданную форму и упруго деформировались при механическом воздействии. Матриксы не деградировали в 70% спирте, однако прочность изделий, содержащих 40% и более желатина, значительно уменьшалась в воде.

Композитные матрицы обладали равномерной пористой структурой, схожей со структурой матриц, не содержащих желатин. Диаметр пор образцов составлял 70-90 мкм, как и у матриц на основе фиброина, при этом пористость матриц уменьшалась при увеличении концентрации желатина.

В ходе исследования *in vitro* было выявлено, что внесение желатина в структуру матрицы способствует повышению адгезии и ускорению пролиферации МЭФ. Уже через сутки культивирования количество клеток на композитных матрицах было выше, чем на образцах из фиброина. На четвертый день исследования количество МЭФ на поверхности матриц на основе фиброина уменьшилось из-за миграции клеток в недоступные для изучения глубокие слои матрицы.

При содержании в образцах до 30% желатина адгезия клеток к их поверхности увеличивалась, при этом часть клеток также мигрировала вглубь матриц, в то время как при концентрации желатина выше 40% наибольшее количество клеток было сосредоточено в верхних слоях матрицы.

Увеличение скорости адгезии и пролиферации МЭФ связано с наличием в структуре желатина последовательностей RGD (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), связывающихся с интегринами – мембранными белками, участвующими в регуляции этих процессов. Также на увеличение скорости адгезии может влиять изменение заряда поверхности, вызванное экранированием отрицательно-заряженного фиброина нейтральным желатином. При внесении более 40% желатина в структуру матрицы скорость миграции МЭФ снижается.

Таким образом, оптимальное содержание желатина в составе матрицы составляет 30%, так как при данной концентрации наблюдается значительное увеличение скорости адгезии и пролиферации МЭФ на поверхности матриц при сохранении их структуры и физических свойств.

### **Эффект уменьшения концентрации глюкозы в плазме пробы крови после ее насыщения кислородом**

***Краснова Мария Алексеевна, Зайцева Галина Владимировна, Маслова Марина Николаевна***

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Россия, Москва, mashavin@mail.ru*

В данной работе обсуждается новый эффект, связанный с особенностями транспорта глюкозы через мембрану эритроцитов. Он заключается в уменьшении концентрации глюкозы в плазме пробы крови после ее оксигенации.

Объектом исследования являются эритроциты человека. Эксперименты проводились или на цельной крови, или на пробах крови, подготовленных из эритроцитарной массы. Измерения концентрации глюкозы в плазме проб крови проводились с помощью глюкометра «Optium Omega», показания которого не зависят от напряжения кислорода в пробе. В исходной пробе крови измеряли концентрацию глюкозы, затем 1 мл этой крови помещался в кювету прибора ГАММА (разработанного в нашей лаборатории), где контролируемо осуществлялось максимальное насыщение крови кислородом. После чего в этой пробе измеряли концентрацию глюкозы. В проведенных 12 опытах полученные значения всегда были меньше исходного. Уменьшение значения концентрации глюкозы после оксигенации составляло более 20 % от исходной величины с достоверностью 99,9 %. При деоксигенации насыщенных кислородом проб крови (в 4 опытах) наблюдался обратный эффект: увеличение значения концентрации глюкозы в плазме пробы практически до исходного значения.

Обнаруженный эффект может быть объяснен влиянием двух факторов: перестройкой липидной мембраны и изменением ее проницаемости для глюкозы, а также изменением сродства глюкозы к гемоглобину в окси- форме. Перестройка структуры мембраны эритроцита при оксигенации, возможно, происходит из-за увеличения в ней поля в результате десорбции оксигемоглобина. При этом проницаемость мембраны для асимметричной молекулы глюкозы, обладающей дипольным моментом и ориентируемой в поле, оказывается выше при прохождении глюкозы внутрь эритроцита, чем при ее выходе наружу. Чем выше поле в мембране, тем больше разница в величинах равновесных концентраций глюкозы по обе стороны мембраны эритроцитов. К такому же эффекту может приводить более высокое сродство молекул глюкозы к оксигемоглобину, чем к его дезокси- форме. Изучение обнаруженного эффекта, по нашему мнению, может иметь как научную, так и практическую ценность.

Первые гипотезу об изменении проницаемости мембран для дипольных, асимметричных молекул высказал А.А. Чарахчян, сотрудник ФИАНа.

### **Роль липидной мембраны в процессе димеризации трансмембранных альфа-спиралей гликофорина А.**

**Кузнецов Андрей Сергеевич**

*Московский физико-технический институт, Россия, г. Долгопрудный,  
andrej.kuznecov@phystech.edu*

Трансмембранные домены мембранных рецепторов часто представлены одной или несколькими альфа-спиралями, пронизывающими липидный бислой. Они играют важнейшую роль в процессе формирования пространственной структуры и функционировании рецепторных систем клетки. Одним из наиболее изученных мембранных белков является гликофорин А, трансмембранный домен которого представлен единственной альфа-спиралью. Димеризация данного белка многократно изучалась с помощью теоретических и экспериментальных методов, однако роль липидной мембраны в данном процессе остается неясной. В настоящей работе с помощью методов молекулярного моделирования проводили анализ свойств липидов вблизи трансмембранных доменов гликофорина А. Использовали модели мономера и димера трансмембранного домена в гидратированном липидном бислое в полноатомном приближении. Показали, что мономер белка способен вызывать появление неоднородностей в липидном бислое. Наблюдали «замораживание» липидов вблизи полярной интерфейсной стороны амфифильной альфа-спирали вблизи остатков Gly79 и Gly83, являющихся критическими для процесса димеризации. При формировании димера происходило вытеснение связанных молекул липидов из данной области. Расчет значений свободной энергии ассоциации предсказывает значительный энергетический вклад со стороны липидной мембраны. Предполагается, что липиды могут играть важную роль в процессах димеризации трансмембранных доменов мембранных белков.

### **Анализ первичных процессов фотосинтеза *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, 1888 методом математического моделирования**

**Лисицына Анастасия Александровна**

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, lisitsinan@gmail.com*

Световые процессы фотосинтеза являются начальным звеном последовательности метаболических реакций фотосинтезирующих организмов. Одним из способов получения информации о состоянии фотосинтетического аппарата и характеристиках протекающих в нём

процессов является математическое моделирование. Модели обычно включают в себя описание процессов, происходящих в фотосистеме II, но отличаются разной степенью детализации. Редуцированная модель фотосистемы II содержит детальные характеристики всех стадий, но достаточно проста для исследования за счёт сокращения количества кинетических уравнений методом квазиравновесных состояний.

В данной работе редуцированная модель была применена для анализа кривых индукции флуоресценции клеток *C. reinhardtii*, выращенных в различных условиях. В программе DBSolve с помощью генетического алгоритма оптимизации по экспериментальным данным был проведен одновременный поиск параметров детальной и редуцированной моделей, при которых они наилучшим образом ложатся на экспериментальные точки. Отдельно на редуцированной модели были проанализированы кривые индукции флуоресценции клеток *C. reinhardtii*, выращенных в нормальных условиях и условиях стресса при серном голодании. Были найдены параметры переноса электрона в комплексе фотосистемы II и определены стадии, в которых происходили наиболее существенные изменения в результате серного голодания. Было показано, что увеличиваются константы переноса электрона на первичный хинонный акцептор  $Q_A$  и уменьшается константы переноса электронов на вторичный хинонный акцептор  $Q_B$ .

Полученный результат согласуется с гипотезой о том, что в результате серного голодания увеличивается поток электронов в фотосинтетическую цепь из цепи метаболических реакций, восстанавливая  $Q_B$ , что обуславливает снижение скорости переноса электрона с  $Q_A$  на  $Q_B$ . Сравнение детальной и редуцированной моделей показало, что время счета последней на порядок меньше, чем детальной, что позволяет использовать редуцированную модель для экспресс-анализа большого количества экспериментальных данных.

### **Влияние параметров слияния энуклеированного ооцита и донорской соматической клетки на развитие клонированных эмбрионов свиней *in vitro***

*Лопухов Александр Викторович*

*Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства, Россия, Подольск,  
vubi\_myaso@mail.ru*

В настоящее время работы по соматическому клонированию и созданию биоинженерных форм с использованием данной технологии ведутся во всем мире. Низкая эффективность метода и высокая частота аномального развития клонов указывает на необходимость проведения исследований, направленных на оптимизацию отдельных этапов получения клонированных эмбрионов. Настоящая работа была направлена на определение параметров слияния энуклеированного ооцита и соматической клетки свиней методом электропробоя мембран контактирующей пары в импульсном электрическом поле. Выделенные из яичников ооцит-кумулюсные комплексы (25-30 в группе), культивировали в течение 42-44 часов в модифицированной среде TC 199, затем обрабатывали 0,1% раствором гиалуронидазы, удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем. Полученные в результате реконструирования ооцитов (энуклеации собственных метафазных хромосом и введения в перивителлиновое пространство фетальных фибробластов) комплексы помещали в микрокамеру для электрослияния. На первом этапе исследований их подвергали воздействию электрического поля переменного тока в 3 и 5 В продолжительностью 5, 10, 15, 20 и 25 секунд и оценивали ориентацию комплексов относительно силовых линий электрического поля. Затем определяли действие 1-3 последовательных прямоугольных импульсов постоянного тока в 20, 25, 30 и 40 В продолжительностью 15 и 30 мкс на объединение клеток в комплексе и развитие полученных цитогридов ( $n=4$ ). Для этого комплексы культивировали среде NCSU-23 в

течение 6 дней. С точки зрения расхождения ооцитов к электродам и их качества наилучшим был импульс переменного тока напряжением 5 В продолжительностью 10 секунд. Наибольшая доля слияния (81,2 %), дробления (61,8 %) и развития бластоцист (19,1 %) наблюдалась при использовании двух последовательных импульсов постоянного электрического поля напряжением 25 В продолжительностью 30 мкс. Таким образом, эффективность слияния энуклеированного ооцита и соматической клетки зависит от напряжения, продолжительности и кратности электрического импульса. При использовании для этих целей Мультипоратора фирмы Eppendorf оптимальным является воздействие двух последовательных импульсов постоянного электрического поля напряжением 25 В продолжительностью 30 мкс, которому предшествует импульс переменного электрического поля напряжением 5 В продолжительностью 10 сек.

### **Статистический анализ данных, получаемых для образцов плазмы крови методами динамического рассеяния света**

*Маслова Марина Николаевна, Бурханов Илья Сергеевич*

*ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Отделение Оптики, Москва, Россия, maslova\_marina87@mail.ru*

В настоящее время методы динамического рассеяния света (ДРС) успешно применяются для исследования образцов биологических жидкостей. С их помощью определяют коэффициенты диффузии, размеры, а также молекулярные массы соединений.

Объектом исследования настоящей работы является плазма крови, которая представляет собой концентрированную полидисперсную систему. В ее состав входят мономерные соединения (белки, липиды и углеводы), их комплексы, а также везикулярные частицы. После взятия крови из организма состав плазмы изменяется в результате протекающих в ней процессов агрегации и протеолитической деградации соединений, что делает образцы плазмы крови неустойчивыми. В связи с этим исследование изменений во времени характеристик светорассеяния в образцах плазмы крови может дать дополнительную информацию об объекте.

Целью данной работы является исследование динамики распределений интенсивности рассеянного света по размерам частиц в образцах плазмы крови и статистическая обработка полученных данных.

Для исследования образцов нативной плазмы гепаринизированной крови различных доноров использовалась стандартная установка ДРС. Для каждого образца были получены распределения интенсивности рассеянного света по размерам частиц. Измерения проводились с интервалом 1,5-2,5 минуты в первые 5 часов после взятия крови и спустя сутки в том же режиме. В распределениях присутствовало по 3-4 пика размеров частиц. Средний по каждому пику размер наносился на график в координатах  $r$  (радиус) –  $t$  (время с момента центрифугирования крови). Весь массив экспериментальных данных составлял для разных образцов от 200 до 500 точек. С помощью статистической обработки этих массивов были получены распределения вероятностей регистрации средних размеров частиц в исследованных образцах. Выяснено, что распределения вероятностей, полученные для одного образца на первый и на второй день, практически не отличаются друг от друга, что говорит об устойчивости этой характеристики. Подчеркнем, что отдельные распределения (непосредственный экспериментальный выход с установки ДРС) могли существенно отличаться от результата статистической обработки их динамики.

Предложенный статистический анализ данных, получаемых с помощью ДРС для образцов плазмы крови, может позволить разработать новые методики контроля состояний организма доноров и диагностики патологий.

### **Исследование редокс-состояния цитохрома *c* дыхательной цепи интактных митохондрий при модуляции активности электронного транспорта**

***Никельшпарг Эвелина Ильинична***

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва, evelinanick@gmail.com*

Изменение редокс-состояния цитохрома *c* дыхательной цепи (ЭТЦ) митохондрий необходимо для нормального функционирования ЭТЦ и синтеза АТФ. При этом, нарушение переноса электронов цитохромами лежит в основе многих патологических процессов в митохондриях. Так, сверхпродукция активных форм кислорода и инициация апоптоза напрямую связаны с изменением состояния цитохрома *c*. Современные методы исследования дыхательной активности митохондрий (напр., полярография) не дают представления о редокс-состоянии отдельных компонентов дыхательной цепи. Нашей группой впервые было показано, что спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. SERS) дает возможность избирательно исследовать конформацию и редокс-состояние цитохрома *c* в интактных митохондриях при низких концентрациях образца. Этот эффект связан с многократным усилением КР цитохрома *c* (но не других компонентов ЭТЦ) при помещении митохондрий на плазмонные наноструктуры серебра.

Целью представленной работы являлось исследование редокс-состояний цитохрома *c* в интактных функционирующих митохондриях при модуляции активности переноса электронов в ЭТЦ и синтеза АТФ. Для регистрации спектров ГКР суспензию интактных митохондрий, выделенных из сердца крысы, помещали на композитные наночастицы из оксида кремния и серебра (SiO<sub>2</sub>-Ag). В работе использовали КР-микроспектрометр InVia Raman с лазером 532 нм и объективом x5, NA 0,15. Было показано, что (1) спектры ГКР интактных митохондрий соответствуют спектрам гемопорфирина *c*-типа; (2) в отсутствие субстратов цикла Кребса спектры ГКР митохондрий содержат пики окисленного цитохрома *c*; внесение пирувата, сукцината и АДФ приводит к увеличению интенсивностей спектров и появлению пиков ГКР восстановленного цитохрома *c*; (3) внесение протонофора CCCP приводит к исчезновению пиков восстановленной формы цитохрома *c*, а искусственное восстановление ЭТЦ митохондрий дитионитом натрия приводит к появлению спектра ГКР от полностью восстановленного цитохрома *c*. Полученные данные свидетельствуют о чувствительности спектроскопии ГКР к изменениям редокс-состояния цитохрома *c* в интактных митохондриях при модуляции активности электронного транспорта в ЭТЦ и синтеза АТФ и изменении трансмембранного градиента ионов H<sup>+</sup>.

### **Композитные матрицы на основе фиброина, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины**

***Орлова Алина Александровна***

*МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва, orlovaselin@gmail.com*

Важнейшие задачи современной регенеративной медицины – разработка и оптимизация способов восстановления поврежденных и утраченных органов, фрагментов тканей, а так же создание искусственных органов на основе биополимеров. Для успешного решения задач необходим правильный подбор биоматериалов, поддерживающих адгезию и пролиферацию клеток, деградирующих до химических производных, не наносящих вред организму. Изделия

на основе фиброина шелка *Bombyx mori* обладают хорошими показателями биосовместимости в сочетании с высокой механической прочностью и эластичностью. Шелк обладает рядом преимуществ: возможность получения водных растворов, способность к биодegradации с образованием аминокислот, термостабильность, доступность, устойчивость к радиации, возможность газовой стерилизации, а также возможность добавления композитных материалов в состав изделий.

Трехмерные матриксы на основе фиброина шелка были получены методом выщелачивания и модифицированы компонентом костной ткани – наногидроксиапатитом (ГА) и/или производным коллагена – желатином. Структуру матриксов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), адгезию и пролиферацию эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) – методом сканирующей конфокальной микроскопии (КЛСМ).

Полученные образцы матриксов поддерживали целостность, принимали заданную форму и не разрушались. Композитные матриксы из фиброина шелка и желатина упруго деформировались при непосредственном механическом нажатии, на основе фиброина шелка и ГА – не деформировались. Диаметр пор матриксов соответствовал внесенным порообразующим частицам (150–300 мкм). Внесение желатина и ГА в состав композитного матрикса не влияет на внешний вид изделий, соединенность пор, проницаемость. Пористость и внешний вид всех образцов матриксов были идентичны. Модификация матриксов одной из композитных добавок приводила к усилению адгезии и ускорению пролиферации МЭФ. При этом адгезия и пролиферация МЭФ на поверхности матрикса, содержащего одновременно две композитные добавки, достоверно выше, чем в присутствии одной из композитных добавок.

В результате работы были изготовлены матриксы на основе фиброина шелка, а также композитные матриксы с добавлением желатина и ГА. Изделия обладают незамкнутой структурой, поддерживают свою целостность и не разрушаются при механических воздействиях. Полученные матриксы могут использоваться для ускорения заживления ран, регенерации костной и других тканей, создания биоискусственных органов. Кроме того, они пригодны для создания модельных систем, предназначенных для изучения *in vitro* взаимодействия клеток с субстратом, миграции клеток и других процессов, изучение которых необходимо проводить в трехмерных клеточных системах (3D-культивирование).

## **Исследование биологической активности рекомбинантных препаратов цитокина TRAIL и его DR5-специфических мутантных вариантов DR5-A и DR5-B**

*Пономаренко Анна Дмитриевна*

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, [ponomarenko.ad@yandex.ru](mailto:ponomarenko.ad@yandex.ru)*

Применение цитокинов в качестве проапоптогических агентов является быстро развивающимся направлением в области противоопухолевой терапии. Высокая биологическая активность и отсутствие токсичности для нормальных клеток делают рекомбинантные препараты цитокина TRAIL перспективными кандидатами для терапии опухолей. Взаимодействие TRAIL с рецепторами-ловушками (DcR1, DcR2, OPG) препятствует использованию цитокина для терапии опухолевых заболеваний, но эта проблема может быть решена путем применения рецептор-селективных мутантных вариантов белка TRAIL, которые связываются с рецепторами смерти (DR4 или DR5), но не взаимодействуют с рецепторами-ловушками.

В лаборатории инженерии белка ИБХ РАН были получены два рецептор-селективных мутанта DR5-A и DR5-B. Согласно данным поверхностного плазмонного резонанса, мутантные варианты DR5-A и DR5-B связываются с рецептором DR5 так же эффективно, как и дикий тип,

и практически не взаимодействуют с рецептором смерти DR4 и рецепторами-ловушками TRAIL. После наработки и очистки целевого препарата была изучена биологическая активность препарата: характер и уровень гибели клеток, уровень экспрессии рецепторов на поверхности клеток и в цитоплазме при обработке цитокином, рецептор-селективными мутантными вариантами TRAIL, а также под действием протеасомного ингибитора бортезомиба методом проточной цитофлуориметрии, уровень экспрессии рецепторов при помощи выделения тотальной РНК и проведения ОТ-ПЦР и др.

В ходе работы были экспрессированы и очищены препараты мутантных вариантов цитокина TRAIL DR5-A и DR5-B из клеток *E. coli*. Исследования апоптотической активности препаратов показали, что рецептор-специфические варианты цитокина TRAIL DR5-A и DR5-B в несколько раз эффективнее убивают клетки U937 по сравнению с цитокином TRAIL дикого типа как отдельно, так и совместно с бортезомибом, а также был показан синергический эффект при их совместном использовании. Максимальный апоптотический эффект наблюдался при обработке клеток монобластической лейкемии U937 препаратом DR5-B. Кроме того, был определен уровень экспрессии рецепторов смерти и рецепторов ловушек TRAIL на поверхности клеток и в цитоплазме, а также влияние химиотерапевтического препарата бортезомиб на экспрессию рецепторов смерти DR4 и DR5 на поверхности клеток. Было показано, что протеасомный ингибитор бортезомиб более чем в два раза увеличивает экспрессию DR4-рецептора, и на 20,54% увеличивает экспрессию DR5-рецептора. Тем самым, был подтвержден механизм сенситизации клеток монобластической лейкемии U937 бортезомибом.

**Использование магнитных наночастиц для эффективного выделения гемопоэтических стволовых клеток при культивировании на стромальных слоях**

<sup>1</sup>Раевская Александра Андреевна, <sup>1</sup>Савватеева М.В., <sup>2</sup>Краснов В.П., <sup>1</sup>Белявский А.В.

<sup>1</sup>Институт Молекулярной Биологии имени В.А.Энгельгардта, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт Органического Синтеза имени И.Я.Постовского, Екатеринбург, Россия,  
*araevskaia@gmail.com*

В настоящее время системы совместного культивирования клеток применяются в таких областях, как клеточная биология и тканевая инженерия, а также приобретают особую важность в гематологии для экспансии гемопоэтических стволовых (ГСК) и прогениторных клеток. Стромальное кокультивирование ГСК является перспективной альтернативой культивированию с цитокинами, поскольку лучше имитирует микроокружение ГСК в костном мозге. Одной из главных технических сложностей при этом является контаминация популяций ГСК клетками стромы, затрудняющая их последующий анализ и применение. Распространенными подходами к решению этой проблемы до настоящего времени являлись трудоемкая сортировка клеток, способная привести к их гибели, и сбор только неадгезивной фракции ГСК с сохранением целостности стромального слоя ценой потери их прикрепленных и находящихся под стромой популяций. Поскольку последние могут быть обогащены наиболее примитивными предшественниками, этот подход негативно сказывался на качестве и репрезентативности получаемых гемопоэтических фракций.

В рамках настоящего исследования разработан способ магнитного мечения стромальных клеток, который делает возможным их простое и эффективное удаление после совместного культивирования с ГСК и позволяет беспрепятственно получать высокоочищенные препараты ГСК, включая адгезивные и ассоциированные со стромой субпопуляции. Показано быстрое и эффективное мечение нескольких распространенных типов стромальных клеток модифицированными L-лизином ферромагнитными наночастицами Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (МНЧ), которые в настоящее время широко используются для прослеживания судьбы клеток *in vivo*. При



культивировании фракции Lin<sup>-</sup>-клеток костного мозга мыши на таких содержащих МНЧ стромальных слоях выход и чистота получаемых тотальных ядерных клеток, колониеобразующих клеток и субпопуляции малодифференцированных клеток фенотипа Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup>C-kit<sup>+</sup> значительно повышаются по сравнению с неадгезивной клеточной фракцией, собираемой при традиционном стромальном кокультивировании. Преимущества предлагаемого подхода особенно значимы при продолжительном культивировании и работе с наиболее примитивными гемопоэтическими клетками. Таким образом, стромальные слои из меченых МНЧ клеток представляют собой простой, эффективный и удобный инструмент получения популяций гемопоэтических клеток высокой степени чистоты при совместном культивировании.

### **Радиозащитный эффект импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ при действии рентгеновского излучения на ДНК лейкоцитов крови *in vitro***

***Романова Нина Анатольевна***

*Пуцинский государственный естественно-научный институт, Россия, г. Пуцино,  
Московская обл., nromanova\_11@mail.ru*

В современных условиях биологические системы подвергаются одновременному воздействию различных физико-химических факторов окружающей среды. Защита живых организмов от повреждающего действия этих факторов является важной задачей. Цель работы заключалась в исследовании защитных эффектов электромагнитного излучения крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) с различными параметрами и режимами воздействия от повреждающего действия ионизирующего излучения на ДНК лейкоцитов крови мыши *in vitro*. Источником ЭМИ КВЧ служил высокочастотный генератор с эффективными параметрами: несущая частота 42.2 ГГц, плотность потока мощности 100 мкВт/см<sup>2</sup>, длительность экспозиции 20 мин, при импульсной модуляции меандром использовали частоты модуляции 1, 16 и 32 Гц. Лейкоциты крови облучали рентгеновским излучением в дозе 4 Гр на рентгеновской установке РУТ-250-15-1. Анализ уровня повреждений ДНК в клетках проводили с помощью метода "комета-тест" по процентному содержанию ДНК в "хвосте кометы".

Исследование радиозащитного действия ЭМИ КВЧ при облучении клеток непрерывным и импульсно-модулированным неионизирующим электромагнитным излучением показало эффективность только импульсно-модулированного ЭМИ. При облучении клеток рентгеновским излучением в дозе 4 Гр уровень повреждений ДНК лейкоцитов составил около 10%. Облучение клеток крови низкоинтенсивным модулированным ЭМИ КВЧ с использованными частотами модуляции до воздействия ионизирующего излучения приводило к снижению уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови в среднем на 20-26% ( $p < 0.01$ ). При облучении лейкоцитов крови низкоинтенсивным модулированным ЭМИ КВЧ после ионизирующего излучения наблюдалось снижение уровня повреждений ДНК в среднем на 10-15%.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. Защитный эффект от повреждающего действия рентгеновского излучения наблюдался только при действии импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ, непрерывное излучение было неэффективно. При предварительном действии импульсно-модулированного ЭМИ КВЧ эффективность защитного эффекта была выше, чем при действии неионизирующего излучения после воздействия рентгеновского излучения. Предполагается, что в основе защитного эффекта ЭМИ КВЧ может лежать индукция адаптивного ответа наномолярными концентрациями

активных форм кислорода, образующимися под действием импульсно-модулированного излучения.

## **Биодеградируемые композитные пленки на основе регенерированного шелка для тканевой инженерии**

**Сафонова Любовь Александровна, Архипова Анастасия Юрьевна**

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, г.Москва, saf.lyubov.msu@gmail.com*

Нехватка донорских органов для пересадки является одной из актуальных проблем современной трансплантологии. Эту проблему может решить применение искусственных органов, представляющих собой конструкции, содержащие матриксный и клеточный компоненты. Клеточный компонент обеспечивает метаболическую активность изделия, однако, не менее важно подобрать материал, который будет использоваться в качестве матриксного компонента и выполнять все функции межклеточного матрикса: определять физические свойства, обеспечивать адгезию, пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток и пространственную организацию ткани.

Фиброин шелка из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori* имеет уникальные механические свойства и обладает биосовместимостью, что позволяет формировать из него различные изделия: пленки, трубки, трехмерные матриксы, микро- и наночастицы, гели - и использовать в тканевой инженерии как самостоятельный материал или в составе композитов. Для изучения свойств материала были изготовлены пленки из фиброина шелка и композитные пленки на основе фиброина шелка, содержащие по массе 30% коллагена I типа методом кастинга с применением двух различных растворителей – воды и муравьиной кислоты.

Все пленки представляют собой прозрачные изделия, толщиной от 20 до 50 мкм. Анализ структуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии и атомной силовой микроскопии показал, что для всех видов полученных пленок характерна шероховатость поверхности, которая необходима для успешной адгезии клеток, причем шероховатость зависит от применяемого растворителя и выше в случае применения муравьиной кислоты. Для пленок, изготовленных из водных растворов, характерно свойство проницаемости для низкомолекулярных веществ. Все полученные пленки имеют достаточные показатели эластичности и прочности на разрыв для применения в различных областях тканевой инженерии. Наибольшие показатели прочности на разрыв и эластичности обнаружены у пленок, изготовленных из водного раствора фиброина шелка. Добавление коллагена снижает показатель прочности на разрыв, но при этом практически не снижает показатель эластичности. Анализ пролиферативной активности клеток проводили на культуре клеток гепатокарциномы человека Нер-G<sub>2</sub>. Было показано, что пролиферативная активность клеток на пленках, изготовленных из водных растворов фиброина шелка и коллагена, увеличивается в ходе эксперимента, и средний индекс пролиферации клеток культуры Нер-G<sub>2</sub> достигает значения  $4,05\% \pm 0,11\%$  на девятый день эксперимента, что в 20 раз больше индекса пролиферации на пленках, изготовленных из растворов полимеров в муравьиной кислоте.

Таким образом, пленки, изготовленные из водных растворов фиброина и коллагена, имеют подходящие свойства для применения в тканевой инженерии: прозрачность, оптимальную шероховатость поверхности, проницаемость для низкомолекулярных веществ, высокие показатели эластичности и прочности на разрыв. Использование муравьиной кислоты в качестве растворителя увеличивает показатель шероховатости пленки и заметно снижает ее проницаемость и эластичность, но практически не влияет на прочность на разрыв. Все

вышеперечисленные характеристики обеспечивают возможность успешной имплантации изделия в организм.

### **Оценка качества перемешивания фототрофных микроорганизмов в фотобиореакторах с помощью компьютерного моделирования гидродинамики методом решеточных уравнений Больцмана**

***Сенин Дмитрий Сергеевич***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва, seninds@gmail.com*

В последние годы можно наблюдать рост интереса к биотехнологии фототрофных микроорганизмов (ФМ), в том числе к фотобиореакторам как устройствам, позволяющим достичь высокой скорости накопления биомассы. Этот интерес связан с производством биодизеля, а также различных других веществ, таких как каротиноиды, длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты и др. При высокой оптической плотности суспензии ФМ в фотобиореакторах практически весь свет поглощается в тонком приграничном слое клеток, следствием чего является необходимость интенсивного перемешивания суспензии с целью создания более благоприятных условий для прироста биомассы.

Автором был разработан программный комплекс, позволяющий моделировать турбулентное течение суспензии ФМ в фотобиореакторах заданной формы. Решение основано на методе решеточных уравнений Больцмана и реализовано на графических ускорителях, что дает существенное ускорение расчетов, так как одним из основных достоинств используемого алгоритма является его естественная параллельность.

Для оценки качества перемешивания были введены дополнительные параметры, характеризующие динамику ФМ, основанные на анализе траекторий клеток: среднее количество поглощенных фотонов в единицу времени и средняя частота цикла «свет-темнота». Был получен функционал качества, который позволяет оценивать как локальные характеристики конструкций фотобиореакторов (объем высокопродуктивных зон), так и общую эффективность выбранной конструкции. Были произведены расчеты для 32 конструкций плоских фотобиореакторов с различными размерами и взаимным расположением препятствий, обеспечивающих перемешивание суспензии ФМ. Результатом стало нахождение наиболее эффективного размера и взаимного расположения препятствий при заданных параметрах скорости течения и внешних размерах блока фотобиореактора.

На данный момент проблема увеличения скорости производства биомассы в фотобиореакторе является одной из основных. Возможный путь ее решения лежит через повышение интенсивности перемешивания суспензии ФМ, что позволит задействовать большее количество клеток в процессе. Также проблемой является отсутствие дешевого и легкого в использовании инструмента для сравнения и анализа конструкций фотобиореакторов различных видов. Полученные результаты показывают возможность создания высокотехнологичного инженерного инструмента оценки и оптимизации конструкций фотобиореакторов различных видов, основанном на компьютерном моделировании течений с помощью современных эффективных методов вычислительной гидродинамики.

### **Моделирование процесса протонирования молекулы вторичного хинона в фотосинтетическом реакционном центре бактерии *Rb. sphaeroides***

***Степанов Михаил Леонидович, Мамонов П.А.***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия,  
mishc9@gmail.com*

В работе исследован молекулярный механизм сопряжения электронного транспорта в фотосинтетическом реакционном центре бактерии *Rb. sphaeroides* (РЦ) с протонированием молекулы вторичного хинона ( $Q_B$ ). Данный процесс является одним из ключевых этапов преобразования энергии света в электрохимическую разность потенциалов на мембране хромофоров бактерии. Согласно современным представлениям донором первого протона для молекулы вторичного хинона является остаток серина L223. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что серин отдает протон молекуле семихинона ( $Q_B^-$ ) после одноэлектронного восстановления молекулы первичного хинона:  $P^* Q_A Q_B^- \rightarrow P^+ Q_A^- Q_B^- \rightarrow P^+ Q_A^- Q_B H$ . В литературе предполагается, что электростатическое поле  $Q_A^-$  вызывает изменения рК гидроксильной группы серина и 4-C=O группы  $Q_B^-$ , приводящие к переносу протона от серина к  $Q_B^-$ . Однако непосредственное наблюдение данного процесса с использованием экспериментальных методик не представляется возможным.

Целью настоящей работы является подтверждение предполагаемого механизма сопряжения переноса электрона в РЦ с протонированием  $Q_B$  методами молекулярного моделирования. С этой целью была создана комбинированная молекулярно-механическая/квантово-механическая модель РЦ. В квантовую часть модели были включены молекула  $Q_B$  и остаток серина L223, образующие водородную связь. Апобелок и прочие кофакторы вошли в молекулярно-механическую часть модели. Для моделирования эффекта восстановления молекулы  $Q_A$  на положение протона водородной связи L223- $Q_B$  были рассчитаны энергетические эффекты переноса протона от серина к  $Q_B$  в модели с нейтральной и заряженной молекулой  $Q_A$ . Заряд на  $Q_A$  создавался путем модификации парциальных зарядов атомов молекулярно-механической модели  $Q_A$ .

Проделанные расчеты позволили оценить энтальпию переноса протона вдоль водородной связи L223- $Q_B$  в случае нейтральной и заряженной молекулы  $Q_A$ . Результаты расчетов свидетельствуют о стабилизации протонированного состояния  $Q_B$  при наличии заряда на  $Q_A$ .

### **Исследование влияния нанодисперсного диоксида титана на морфометрические показатели нейтрофилов крови человека методом атомно-силовой микроскопии**

*Стулин Дмитрий Сергеевич, Камалтдинов Ильнур Маккиевич*

*Башкирский государственный университет, Центр "Микро- и наномасштабной динамики дисперсных систем", Россия, Уфа, d.stulin@yandex.ru*

Наноматериалы и наночастицы (НЧ), являющиеся продуктом современных нанотехнологий, обладают комплексом уникальных свойств, которые открывают широкие перспективы их промышленного применения. Однако, как и вся новая технология, нанотехнология несет не только несомненные преимущества, но и потенциальную опасность возможного неблагоприятного воздействия наноматериалов на здоровье человека и природные экосистемы. Нейтрофилы (Нф) реагируют на малейшие изменения постоянства внутренней среды, что позволяет рассматривать эти клетки в качестве своеобразного «зеркала гомеостаза». Поскольку изменение объема и формы клеток относятся к числу универсальных составляющих адаптационных и компенсаторных реакций организма при дисфункциях различного генеза нами исследовано влияние нанодисперсного диоксида титана на морфометрический профиль нейтрофилов крови человека.

Нф выделяли из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров на двойном градиенте плотности фиколл-урограцина по методике Подосинникова с соавт. (1981). Для измерения морфологических параметров Нф до и после инкубации в присутствии нанодисперсного диоксида титана клетки фиксировали на твердой подложке с использованием

фиксирующего агента глутарового альдегида (1,5%). АСМ – исследование фиксированных клеток проводили по методике Плесковой с соавт. (2005). Использовали сканирующий зондовый микроскоп Agilent. Сканирование поверхности фиксированных препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе. Использовались кремниевые зонды PPP-CONTRt (Nanosensors) с жесткостью 43 Н/м и резонансной частотой 185 кГц. Показано, что после воздействия наночастиц диоксида титана морфология нейтрофилов изменялась: клетки «набухали», увеличивался их диаметр, объем и высота ядра. Таким образом, проведенное исследование показало, что использование атомно-силовой микроскопии позволяет адекватно оценить характер структурных изменений нейтрофилов в ответ на воздействие наночастиц диоксида титана и получить изображения клеток 3D с высоким разрешением. Обнаруженное нами изменение морфологических параметров нейтрофилов может свидетельствовать о повышении функциональной активности нейтрофилов и возможном цитотоксическом эффекте наночастиц диоксида титана.

### **Изучение и сравнительный анализ механизмов взаимодействия родопсин-подобных рецепторов с G-белками методами компьютерного моделирования**

*Сьянова Дарья Павловна*

*МГУ имени М. В. Ломоносова, кафедра биофизики, биологический факультет, Россия,  
Москва, dariasianova@gmail.com*

G-белок связывающие рецепторы (GPCR – G Protein Coupled Receptors) опосредуют большинство реакций человеческого организма, в том числе чувства вкуса, обоняния и зрения. Малейшие нарушения в структурах рецепторов, G-белков или в механизмах их взаимодействия могут привести к серьезным метаболическим, иммунным, нейродегенеративным, инфекционным или раковым заболеваниям. В связи с этим возникает необходимость изучения и выявления общих закономерностей во взаимодействии GPCR с G-белками.

В качестве объектов исследования были выбраны представители наиболее изученного класса родопсин-подобных рецепторов: метародопсин II (PDB ID 3PQR) и  $\beta 2$  адренорецептор (PDB ID 3SN6), закристаллизованные в активированном состоянии (в комплексах с G-белками); нейротензиновый (PDB ID 4GRV) и аденозиновый  $A_{2A}$  (PDB ID 3QAK) рецепторы, закристаллизованные в полуактивированном состоянии (в комплексах с лигандами-агонистами). Для трехмерных структур белков с помощью программы ProKSim (метод прямого многочастичного моделирования) были рассчитаны электростатические потенциалы; гидрофильные и гидрофобные потенциалы были рассчитаны с помощью web-сервера PLATINUM (Protein-Ligand ATtractions Investigation NUMerically). Сравнение вкладов электростатических и гидрофобных сил во взаимодействие рецептора с G-белком проводилось с помощью метода расчета индексов сходства (SI – Similarity Index) Ходжкина. Визуализация полученных данных осуществлялась в PyMOL.

В работе показано наличие как электростатических, так и гидрофобных участков в области связывания рецепторов с G-белками. Более того, удалось выявить группы аминокислот, опосредующих указанные типы взаимодействий. Для количественной оценки отличий между потенциалами были рассчитаны SI, показывающие значительное сходство как электростатических, так и гидрофобных поверхностных потенциалов исследуемых рецепторов.

Таким образом, было выявлено наличие весьма сходных механизмов взаимодействий родопсин-подобных рецепторов с G-белками. Вероятно, полученные данные можно экстраполировать и на другие классы GPCR, а полученные знания использовать в целях предотвращения целого ряда заболеваний.

**Исследование влияния рН среды на структуру гема гемоглобина методами спектроскопии комбинационного рассеяния и Мёссбауэровской спектроскопии**

***Тхор Евгений Сергеевич***

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Россия, г.Москва,  
e-thor@mail.ru*

Изменения структуры гема гемоглобина могут происходить при различных патологиях, а также при связывании атома железа с лигандом. Для оценки конформации гемопорфирина применяют спектроскопию комбинационного рассеяния, которая широко используется для исследования структуры биологических молекул, что позволяет применять её для обнаружения опухолевых тканей, атеросклеротических бляшек, а также оценки степени оксигенации крови. В свою очередь Мёссбауэровская спектроскопия позволяет получить информацию об электронной структуре железа в геме гемоглобина.

В данной работе использовали сочетание методов спектроскопии комбинационного рассеяния и Мёссбауэровской спектроскопии. Для оценки структуры гема гемоглобина, а также его способности связывать кислород и отдавать лиганды в эритроцитарной массе с увеличением рН применяли спектроскопию комбинационного рассеяния. Мёссбауэровскую спектроскопию использовали для исследования изменений электронной структуры железа гема гемоглобина.

На спектрах гемоглобина, полученных с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния при длине волны лазера 473 нм видно, что структура спектра меняется при увеличении рН в интервале от 5,8 до 8,0. Для определения параметра связывания гема с кислородом использовали соотношения  $I_{1580}/I_{1548}$ , а способность отдавать лиганд –  $I_{1375}/I_{1580}$ . По этим соотношениям было установлено, что при увеличении рН среды сродство кислорода к гемоглобину падает, а способность отдавать лиганды возрастает, что соответствует эффекту Бора.

Мёссбауэровская спектроскопия позволила выявить отличия электронного состояния железа гема гемоглобина, а именно изменение квадрупольного момента и химического сдвига, что говорит о переходе оксигенированной формы в дезоксиформу при повышении рН.

Результаты, полученные с помощью методов спектроскопии комбинационного рассеяния, хорошо согласуются с данными полученными методом Мёссбауэровской спектроскопии. Связывание гема гемоглобина с кислородом вызывает не только изменение конформации гема, но и изменения в электронном состоянии железа гема.

Такое сочетание методов изучения гема гемоглобина в дальнейшем может помочь в диагностике патологий, например, тканевой гипоксии, сердечнососудистых заболеваний, лейкемии и др.

**Молекулярное моделирование процесса образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f**

***Федоров Владимир Андреевич, Хрущев С.С., Коваленко И.Б.***

*МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический ф-т, кафедра биофизики, Россия, Москва,  
xbgth@yandex.ru*

Проблема образования белок-белковых комплексов чрезвычайно актуальна. В процессе образования комплекса белков определяющую роль играют такие факторы, как дальнедействующие электростатические взаимодействия между поверхностями белков,

геометрическая и химическая комплементарность областей связывания, молекулярная подвижность в белок-белковом интерфейсе, гидрофобные взаимодействия. В настоящее время не существует универсального метода моделирования процесса образования комплекса белков, учитывающего все эти факторы, точно предсказывающего структуру образовавшегося комплекса и кинетику этого процесса.

Процесс образования комплекса двух белковых молекул в растворе можно условно разделить на (1) диффузию молекул в растворе, сближение за счет дальнедействующих электростатических взаимодействий и образование предварительного комплекса, и (2) трансформацию предварительного комплекса в финальный (т.е. в такую конфигурацию, в которой осуществляется биологическая функция) посредством конформационных изменений, происходящих в белок-белковом интерфейсе. В нашей модели для пары белков в реакционном объеме производится расчет броуновской динамики с учетом электростатических взаимодействий до тех пор, пока эти белки не образуют предварительный комплекс. После этого взаимодействие этих белков уже описывается более детальным методом полноатомной молекулярной динамики с явным учетом молекул растворителя. Нами разработан программный комплекс, реализующий комбинированный метод молекулярного моделирования с использованием гибридной вычислительной архитектуры. Для вычислений образования предварительного комплекса броуновской динамики используется пакет ProKSim, разработанный на кафедре биофизики биологического факультета МГУ; для молекулярной динамики используется пакет GROMACS (кафедра биофизической химии университета Гронингена, Нидерланды). Создана программа на языке Python, управляющая работой этих двух пакетов в инфраструктуре суперкомпьютера "Ломоносов" суперкомпьютерного центра МГУ.

Нами было проведено несколько предварительных вычислительных экспериментов, в которых было оценено время, за которое белки образуют финальный комплекс, и на основании этого рассчитана константа скорости реакции взаимодействия белков, значение которой составило  $1.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , что согласуется с данными эксперимента. Таким образом, была показана принципиальная возможность моделирования образования комплекса электрон-транспортных белков и оценки скорости их взаимодействия, исходя из структуры белков, что открывает возможности использования комбинированного метода броуновской/молекулярной динамики для анализа кинетики связывания электрон-транспортных белков.

*Работа поддержана CUDA Center of Excellence МГУ.*

## **Ингибирование комплекса Arp2/3 белком арпином**

***Чемерис Ангелина Сергеевна***

*МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, Москва, Angelina1707@mail.ru*

Комплекс Arp2/3 играет главную роль в разветвлении актиновых филаментов. Комплекс Arp2/3 состоит из семи субъединиц: двух актиноподобных белков Arp2 и Arp3, а также пяти дополнительных субъединиц ARPC1-ARPC5. Arp2/3 находится в трех конформациях: открытой, закрытой и промежуточной. Закрытая конформация является активной, при которой мономеры актина садятся на "платформу", образованную белками Arp2 и Arp3. Инактивация комплекса Arp2/3 переводит комплекс в открытую конформацию. По гомологии с такими известными активаторами, как белки синдрома Вискотта-Олдрича (WASP), был найден белок арпин - инактиватор комплекса Arp2/3. Авторы провели исследование субклеточной локализации арпина и влияния его на подвижность клеток, но точное место присоединения не было локализовано. Целью данной работы является получение трехмерной реконструкции

комплекса Arp2/3 с инактиватором арпином. Исследование проводили с помощью метода электронной микроскопии макромолекул. Для этого были приготовлены два типа образцов: контрольные комплексы Arp2/3 и комплексы Arp2/3 с арпином. Очистка комплексов проводилась с помощью аффинной хроматографии. Очищенные комплексы наносились на сетки для электронной микроскопии. Затем были получены электронные фотографии комплексов обоих типов с помощью просвечивающего электронного микроскопа Tescan G12 (FEI). Проекционные изображения комплексов Arp2/3 фиксировались с помощью ПЗС камеры Eagle (FEI) с разрешением 16 Mpix. Для обработки электронных фотографий использовались программы EMAN2.1 и Imagic, с помощью которых вырезанные из микрофотографий частицы были расклассифицированы на 35 классов (контрольные) и 25 классов (с арпином). Подсчет частиц, входящих в состав классов, позволил определить, что контрольные комплексы находятся в трех конформациях, при этом закрытых комплексов — 40%, промежуточных — 24,2%, а открытых — 18,8%. У комплексов Arp2/3, связанных с арпином, отсутствовала активная закрытая конформация, 61,5% комплексов находились в инактивной открытой конформации и 7,7% находились в промежуточной конформации. Таким образом, впервые было показано, что присоединение арпина индуцирует переход Arp2/3 комплекса в открытую конформацию. Путем расчета разностных изображений между контрольными комплексами и комплексами с арпином удалось идентифицировать место взаимодействия ингибитора с Arp2/3. Дальнейшие исследования включают изучение взаимодействия комплекса Arp2/3 с несколькими ингибиторами.

### **Матрицы из природных полиэфиров для инженерии костной ткани**

*Чернобровкина Дарья Александровна*

*Сибирский федеральный университет, Россия, Красноярск, namtuda@ya.ru*

Костная ткань способна к физиологической репарации, однако репаративный потенциал ограничен размером дефекта. Перспективным методом терапии костных дефектов критических размеров является тканевая инженерия. Оптимальным материалом для этой задачи могут стать биосовместимые и биорезорбируемые полимеры семейства полигидроксиалканоатов (ПГА).

Для исследований было получено семейство полимерных матриц разной геометрии и структуры из поли-3-гидроксибутирата: нетканое полотно из неориентированных и ориентированных ультратонких волокон, плёнка, объёмный пористый матрикс (порообразующая матрица – прессованный сахар), композитные матрицы с гидроксиапатитом, полученные методом электростатического формования. Способность матриц поддерживать дифференцировку в остеогенном направлении исследовали в культуре мультипотентных мезенхималных стромальных клеток (ММСК) костного мозга мыши. Способность матриц осаждалась на поверхности гидроксиапатит, являющуюся ключевым фактором остеоинтеграции, оценивали *in vitro* в ходе экспонирования в растворе, имитирующем солевой состав межтканевой жидкости (SBF).

Результаты МТТ-теста показали, что способность матриц поддерживать пролиферацию клеток выше, чем у контрольного образца (полистирол культуральных флаконов). При этом наибольшее количество жизнеспособных клеток с высоким уровнем метаболизма наблюдалось на матрицах, полученных методом электростатического формования: количество клеток на неориентированном ( $24,50 \cdot 10^3/\text{мл}$  и  $25,72 \cdot 10^3/\text{мл}$ ) и ориентированном ( $25,39 \cdot 10^3/\text{мл}$  и  $26,66 \cdot 10^3/\text{мл}$ ) ультратонком волокне превышало контрольные количества ( $12,20 \cdot 10^3/\text{мл}$  и  $12,82 \cdot 10^3/\text{мл}$ ) более чем в два раза на 14 и 21 сутки культивирования соответственно. Исследование щелочной фосфатазы показало её активность в



клетках, культивированных на всех экспериментальных матриксах. Антителами к остеопонтину интенсивнее были окрашены клетки, выращенные на ультратонких волокнах, менее интенсивно – на объёмных матриксах. Энергодисперсионный микроанализ показал, что клетки, расположенные на поверхности полимерных носителей, формировали кальций-фосфатный внеклеточный матрикс. Наиболее активно этот процесс проходил на матриксах, полученных методом электростатического формования. Электронная микроскопия и энергодисперсионный анализ образцов после экспонирования в SBF показали, что формирование сплошного слоя кальций-фосфатного покрытия происходило только на композитных матриксах.

Охарактеризован остеогенный потенциал полимерных матриксов. Из ММСК костного мозга получена первичная культура остеобластов. Состоявшаяся дифференцировка подтверждена маркерными показателями (активность щелочной фосфатазы, продукция остеопонтина, наличие внеклеточных преципитатов кальция). Исследована биологическая активность матриксов *in vitro*. Установлено, что включение частиц гидроксиапатита в структуру полимерных матриксов позволяет значительно повысить их способность образовывать покрытие из гидроксиапатита. Результаты подтверждают возможность использования ПГА матриксов в качестве клеточных носителей в реконструкции костной ткани.

### **Адресный фотосенсибилизатор DARPin-miniSOG: получение и изучение функциональных свойств**

**Черных Ольга Николаевна**

*Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,  
Россия, Москва, olchernykh@yandex.ru*

Фундаментальной проблемой в современной фотодинамической терапии является получение фотосенсибилизаторов, способных селективно накапливаться в опухоли, не вызывая сенсибилизацию здоровых тканей. Данная работа посвящена созданию генетически кодируемого адресного фотосенсибилизатора DARRPin-miniSOG, содержащего в качестве цитотоксического модуля фотоактивируемый флавопротеин miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator), а в качестве адресного – созданный с помощью технологий фагового дисплея белок неиммуноглобулиновой природы DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein), который способен селективно связываться с онкогеном HER2/neu (Human Epidermal growth factor Receptor).

В ходе работы была получена генно-инженерная конструкция, позволяющая суперпродуцировать DARPin-miniSOG в клетках *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) и проводить его очистку с помощью металло-аффинной хроматографии. Фотоиндуцированная цитотоксичность иммунофотосенсибилизатора изучалась как на HER2/neu-отрицательных (HeLa, CHO), так и на HER2/neu-положительных клеточных линиях (SK-BR-3, BT-474) и оценивалась по способности клеток восстанавливать бромид тетразолия. Для выяснения механизма клеточной гибели использовалась флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия.

Нами показано, что в составе белка DARPin-miniSOG модуль DARPin сохраняет высокую аффинность к антигену HER2/neu: константа диссоциации, оцененная с помощью плазмонно-поверхностного резонанса, составляет  $3 \pm 2 \times 10^{-8}$  М. В опытах *in vitro* мы показали, что DARPin-miniSOG специфично воздействует на HER2/neu-гиперэкспрессирующие раковые клетки и эффективно снижает их жизнеспособность при облучении синим светом (460 нм). Наиболее чувствительными к действию DARPin-miniSOG являются клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, IC<sub>50</sub> для них составляет 2,1 мкМ. Облучение клеток в присутствии DARPin-miniSOG и аскорбиновой кислоты в концентрации 60 нМ снижает токсичность

DARPin-miniSOG в 16,3 раза ( $IC_{50} = 34,2 \mu M$ ). Это ожидаемо, поскольку цитотоксическое действие эффекторного домена основано на выработке активных форм кислорода. Также мы установили, что облучение клеток в присутствии DARPin-miniSOG приводит к нарушению целостности клеточной мембраны; хромосомная ДНК клеток после облучения остается нефрагментированной. Таким образом, механизмом клеточной гибели является некроз.

Таким образом, результаты работы показывают принципиальную возможность получения генетически кодируемого адресного фототоксина: полученный нами DARPin-miniSOG обладает высокой специфичностью к опухолевому антигену и высокой фотоиндуцируемой цитотоксичностью.

*Работа поддержана грантом РФФИ №12-04-01083.*

**Особенности гидролиза АТФ  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазой мембран зародышей вьюна при действии микроволнового электромагнитного излучения**

***Яремчук Мария Михайловна, Мандзинец Светлана Михайловна, Санагурский Дмитрий Иванович***

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина, г. Львов, manisvit@gmail.com*

Влияния среды на клетку реализуется разными путями, но многие из них тесно связаны с мембранными структурами, как внешней плазматической мембраной, так и мембранными органеллами. Электромагнитное излучение мобильных телефонов имеет разнообразное влияние на живые клетки. Используя  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазу зародышевых клеток вьюна *Misgurnus fossilis* L, как удобную модель для изучения механизмов действия различных факторов которые способны реализоваться через мембрану, исследовали особенности гидролиза АТФ этим ферментом после облучения зародышей мобильным телефоном.

Мембранную фракцию зародышей получали методом дифференциального центрифугирования. Зародыши после оплодотворения облучали мобильным телефоном в режиме разговора 5 минут, после чего зародыши развивались в растворе Гольтфретера и отбирались на исследуемых стадиях развития (2, 64 бластомера и 10 деление бластомеров) для выделения мембранных фракций. Оценку ферментативной активности определяли за количеством  $\Phi_n$  по модифицированному методу Фиске-Суббароу при добавлении различного количества субстрата АТФ (0,1-3 ммоль).

Установлено ингибирование гидролиза АТФ исследуемым ферментом на стадии 2 бластомеров в сравнении с контрольными образцами. В отличие от контроля кривая гидролиза АТФ не достигает плато при максимальной концентрации АТФ (3 ммоль), активность фермента становила 46,7 % от контроля. Значительное снижение активности (43,7 % от соответственного контроля) фермента отмечено уже при добавлении 0,5 ммоль АТФ. На стадий 64 бластомеров кинетика гидролиза АТФ ферментом схожая, хотя в целом активность фермента возрастает на 10-20% в сравнении с предыдущей стадией (сравнение относительно контроля). На стадии 10 деления бластомеров отмечено снижение активности до 30,6% контрольной активности при концентрации АТФ 3 ммоль, а кинетическая кривая не выходит на плато в отличие от контроля.

Одноразовое облучение зародышей излучением мобильного телефона приводит к изменениям кинетики гидролиза АТФ  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазой в зависимости от концентрации субстрата и стадии развития, значительные изменения отмечены на стадии 10 деления бластомеров. Линеаризация кривых в координатах Лайнуивера-Берка показывает уменьшение как константы Михаелиса, так и максимальной скорости облученных ферментов. Такие

изменения могут быть следствием нарушений функциональной активности мембран и самого фермента при воздействии данного облучения.

**Магнитно-люминесцентные наночастицы, полученные на основе магнетита и апконвертирующих нанофосфоров, как перспективные наномаркеры в исследованиях *in vivo***

<sup>1,2</sup>Яценко Дарья Олеговна, <sup>1,3</sup>Зеленукин И.В.

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, ветеринарно-биологический факультет, Москва, Россия; <sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область, Россия, [yatsdarya@gmail.com](mailto:yatsdarya@gmail.com)

В настоящее время в бионанотехнологии перспективным является применение магнитно-люминесцентных наночастиц (МЛНЧ). МЛНЧ были получены микроэмульсионным методом на основе наночастиц магнетита  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$  и апконвертирующих нанофосфоров  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}\text{Er}^{3+}$ . МЛНЧ - многофункциональные структуры, которые могут использоваться как в диагностике, так и терапии заболеваний. Для создания на их основе тераностических агентов необходимым этапом исследования является изучение их фармакокинетических параметров, в частности, распределения по органам и измерение их периода полувыведения из кровотока.

В нашей работе для детекции МЛНЧ мы использовали два метода: метод регистрации нелинейных материалов по их перемагничиванию в переменном поле, генерируемом на двух частотах, и эпилюминесцентный оптический имиджинг. Регистрация люминесцентного сигнала в более коротковолновой части спектра по сравнению с длиной волны возбуждения позволяет исключить вклад автолюминесценции ткани. Метод регистрации нелинейных материалов по их перемагничиванию в переменном поле позволяет детектировать магнитные наномаркеры в кровотоке в реальном времени. Кроме того, с помощью него можно получить интегральную количественную информацию о накоплении частиц в органах.

Было проведено изучение периода полувыведения МЛНЧ из кровотока здоровых мышей и мышей с аденокарциномой молочной железы. Обнаружено, что период полувыведения МЛНЧ из кровотока здоровых мышей больше, чем из кровотока мышей с опухолями.

При использовании метода регистрации нелинейных материалов по их перемагничиванию в переменном поле, генерируемом на двух частотах, установлено, что МЛНЧ, введенные в кровотоки здоровым мышам накапливаются преимущественно в печени, селезёнке, лёгких, а МЛНЧ введенные мышам с аденокарциномой молочной железы - в печени и селезёнке. С помощью обоих методов детекции МЛНЧ были обнаружены в опухолях.

При использовании эпилюминесцентной оптической имиджинговой системы люминесцентный сигнал регистрировался в легких, суставах, мочевом пузыре здоровых мышей. У мышей с аденокарциномой молочной железы обнаружено яркое свечение в опухолях.

Таким образом, МЛНЧ являются перспективными наномаркерами для исследований *in vivo*.

Авторы выражают благодарность Дееву С.М., Никитину М.П., Звягину А.В., Хайдукову Е.В., Гуллер А.Е., Нечаеву А.В.