

12 - Биофизика, медицинская физика

Аганова Оксана Вартановна, инженер
Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт физики
Исследование конформаций и динамики новых четвертичных фосфониевых солей на основе пиридина методами ЯМР спектроскопии

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.
e-mail: aganova9@gmail.com стр. 366

Баранова Анна Александровна, магистрант 2 года обучения
Екатеринбург, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, физико-технологический институт

Исследование радиационно - химических процессов при радиационной обработке молока

Черешнев Валерий Александрович, д.м.н.
e-mail: baby_aaa@mail.ru стр. 367

Блохин Дмитрий Сергеевич, ассистент
Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт физики
Установление активных центров пептида PAP248-286, отвечающего за усиление инфекционной активности вируса ВИЧ методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.
e-mail: dblohin@kpfu.ru стр. 368

Васич Ксения Николаевна, 5 курс
Волгоград, Волгоградский государственный технический университет, электроники и вычислительной техники
Дисперсионное уравнение и устойчивость потоков ионов при учете нелинейности профиля потенциала на мембране

Грецова Наталья Владимировна, к.ф.-м.н.
e-mail: dazdrapermusya@gmail.com стр. 369

Гибашева Ирина Валерьевна, 1 курс
Омск, Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, физический
Выявление температурных распределений в акупунктурных точках на поверхности тела человека при помощи тепловизора

Потуданская Мария Геннадьевна, к.б.н.
e-mail: irina-gibasheva@mail.ru стр. 371

Жирков Александр Валерьевич, 5 курс
Волгоград, Волгоградский государственный технический университет, электроники и вычислительной техники
Исследование зависимости скорости прорастания зерен пшеницы от условий воздействия на них ЭМИ СВЧ

Никулин Роман Николаевич, к.ф.-м.н.
e-mail: jibor@mail.ru стр. 372

Жураковская Юлия Олеговна, 4 курс
Уфа, Башкирский государственный университет, физико-технический институт
Резонансное поглощение электромагнитных волн биотканями

Гоц Сергей Степанович, д.ф.-м.н.
e-mail: Jukkiz@gmail.com стр. 373

Згадзай Юрий Олегович, 3 курс
Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт физики
Исследование протегрина PG-1 в водной среде методом спектроскопии ЯМР

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.
e-mail: yurchubuk@yandex.ru стр. 375

Карпенко Полина Александровна, 3 курс
Красноярск, Сибирский федеральный университет, институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Рестрикционный анализ ДНК *R.Phosphoreum* подверженных воздействию трития валина, меченного тритием
Селиванова Мария Александровна, к.б.н.
e-mail: Polinakarpenok@gmail.com стр. 376

Ковель Екатерина Сергеевна, 3 курс
Красноярск, Сибирский федеральный университет, институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Исследование антиоксидантных свойств фуллеренола C₆₀(OH)_x с использованием биолюминесцентной тестовой системы
Тарасова Анна Сергеевна, к.б.н.
e-mail: kkovel@yandex.ru стр. 377

Колосова Ольга Андреевна, 3 курс
Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, институт физики
Образование комплекса полипептидного гормона инсулина с моделью биологической мембраны по данным спектроскопии ЯМР
Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.
e-mail: kolosova.olga11@gmail.com стр. 379

Медведев Кирилл Андреевич, 4 курс
Екатеринбург, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, физико-технологический институт
Математическая модель электрической и механической функции одномерного волокна сердечной мышцы
Курсанов Александр Геннадьевич
e-mail: cirili@mail.ru стр. 380

Михайлова Татьяна Андреевна, 2 курс
Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет, физический
Морфология и микроэлементный состав желчных камней: исследования рентгеноспектральными методами и методами электронной микроскопии
Яловега Галина Эдуардовна, д.ф.-м.н.
e-mail: tanymisha@mail.ru стр. 381

Панфилова Виктория Викторовна, 3 курс
Обнинск, Медицинский радиологический научный центр Минздрава России, отдел исследования комбинированных воздействий
Влияние острого гамма-облучения самцов крыс в дозе 0,5 Гр на психофизиологическое развитие их потомства
Жаворонков Леонид Петрович, д.м.н.
e-mail: whiskas04@yandex.ru стр. 382

Розенбаум Юлия Андреевна, 4 курс
Томск, Сибирский государственный медицинский университет, медико-биологический
Влияние сероводорода на Ca²⁺-зависимую гиперполяризацию мембраны эритроцитов человека
Петрова Ирина Викторовна, д.м.н.
e-mail: julia-rozz@mail.ru стр. 383

Симанов Евгений Владимирович, 4 курс
Уфа, Башкирский государственный университет, физико-технический институт
Разработка методик приготовления образцов молекул ДНК с целью их успешного наблюдения с помощью атомно-силового микроскопа
Шарипов Талгат Ишмухамедович, к.ф.-м.н.
e-mail: simanov19911121@mail.ru стр. 385

Смирнова Оксана Дмитриевна, н.с.
Москва, Национальный исследовательский центр `Курчатовский институт`, НБИКС-центр
Спектроскопия эндогенной флюоресценции как метод контроля за состоянием тканей барабанной перепонки после хирургического лечения экссудативного среднего отита
Свиштушкин Валерий Михайлович, д.м.н.
e-mail: smirnovaOksana@ya.ru стр. 388

Смирнова Оксана Дмитриевна, н.с.
Москва, Национальный исследовательский центр `Курчатовский институт`, НБИКС-центр
Флюоресцентная визуализация фармакокинетики микрокапсул
Букреева Татьяна Владимировна, к.т.н.
e-mail: smirnovaOksana@ya.ru стр. 386

Тофтул Иван Дмитриевич, 2 курс
Волгоград, Волгоградский государственный технический университет, электроники и вычислительной техники
Моделирование потока крови в сосудах с учётом турбулентности
Грецова Наталия Владимировна, к.ф.-м.н.
e-mail: toftul.ivan@gmail.com стр. 389

Хаишбашев Геворг Арменакович, 4 курс
Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет, физический
Исследование медицинских препаратов в биологических тканях оптическими методами. Исследование медицинских препаратов в биологических тканях оптическими методами
Гуда Александр Александрович, к.ф.-м.н.
e-mail: gevorik18@gmail.com стр. 391

Шестакова Надежда Владимировна, аспирант 3 года обучения
Киров, Вятский государственный университет, биологический
Определение биологической концентрации лактобацилл в суспензиях с помощью спектрофотометрического метода
Маракулин Игорь Вадимович, д.м.н.
e-mail: shnadic@yandex.ru стр. 391

Юнусов Артем Рустамович, 3 курс
Ижевск, Удмуртский государственный университет, биолого-химический
Влияние пероксидазы на процесс электрополимеризации толуидинового синего
Черенков Иван Анатольевич, к.б.н.
e-mail: bmxi@ya.ru стр. 393

Япаров Богдан Ярославович, 1 курс
Екатеринбург, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина, институт естественных наук
Электронно-конформационная модель рианодиновых каналов сердечной клетки
Москвин Александр Сергеевич, д.ф.-м.н.
e-mail: ybogdan@yandex.ru стр. 395

Исследование конформаций и динамики новых четвертичных фосфониевых солей на основе пиридина методами ЯМР спектроскопии

Аганова Оксана Вартановна

Галиуллина Лейсан Фаридовна, Аганов Альберт Вартанович, Пугачев Михаил Владимирович,
Штырлин Никита Валерьевич, Штырлин Юрий Григорьевич, Клочков Владимир Васильевич

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.

aganova9@gmail.com

Фосфорорганические соединения широко используются в медицинской химии. Среди них особый интерес представляют соли четвертичного фосфония, а именно, витамин В6 (пиридоксин), так как он необходим в качестве исходного соединения. Данный витамин участвует в более чем сотни ферментативных реакций, которые в свою очередь задействованы в биосинтезе обмена веществ и регуляторных функций в живых организмах.

Для создания новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов с заданными свойствами важно иметь информацию о трехмерной структуре и динамике соединений в растворе. С этой точки зрения, для решения подобных задач одним из мощнейших инструментов является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Он позволяет не только установить пространственную структуру соединений и исследовать динамические процессы с качественной точки зрения, но и определить количественные термодинамические параметры конформационных переходов.

Данное исследование посвящено изучению конформаций и динамики новых производных четвертичных фосфониевых солей на основе пиридина. Для исследуемых соединений 5,6-Бис (метилентрифенилфосфоний)-2,2,8-триметил-4Н-[1,3] диоксино[4,5-с] пиридин дихлорид (далее соединение **I**) (рис.1,а) и 5,6-Бис (метилентрифенилфосфоний)-2,8-диметил-4Н-[1,3] диоксино[4,5-с] пиридин дихлорид (далее соединение **II**) (рис.1,б) были записаны спектры ^1H (500.13 МГц), ^{31}P (202. МГц), ^{13}C (125.758 МГц) ЯМР на спектрометре Bruker "Avance -500 II TM" при изменении температуры образцов.

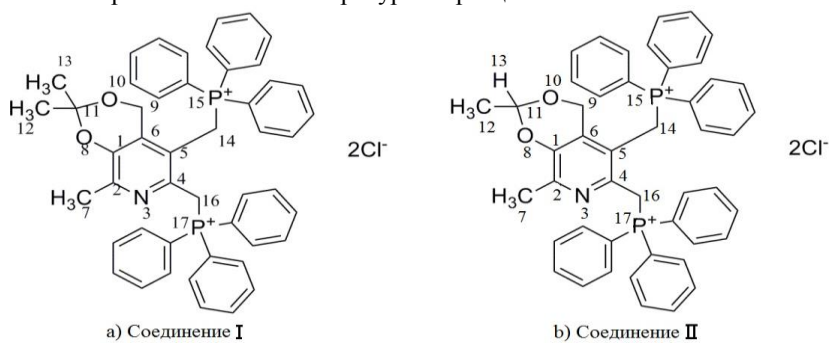


рис.1. Химические структуры исследованных соединений

Далее с помощью программы WinDNMR-Pro 7.1.14 проанализированы формы линий ЯМР сигналов и определены термодинамические параметры конформационных переходов (ΔG_0 – свободная энергия равновесия, ΔH^\ddagger - энтальпия активации, ΔG^\ddagger - свободная энергия активации) с использованием уравнения Эйринга и Винн-Джонса (значения приведены ниже).

	Функциональная группа	ΔG_0 кДж/моль	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔG^\ddagger , кДж/моль ($T_c=243\text{K}$)
Соединение I	CH_3 -12,13	-	38.0 ± 0.5	37.9
	CH_2 -14,16	-	38.2 ± 0.5	37.5
Соединение II	CH_2 -14	1.86	37.4 ± 0.5	37.1
	CH_2 -14'	1.86	37.4 ± 0.5	37.1
	CH_2 -16	1.86	38.0 ± 0.5	36.8
	CH_2 -16'	1.86	37.4 ± 0.5	37.1

Таким образом, для соединений **I** и **II** наблюдается конформационный обмен между двумя структурами, полученными за счет одновременных симметричных поворотов $\text{P}^+(\text{Ph})_3$ групп вокруг связей $\text{C}5\text{-C}14$ и $\text{C}4\text{-C}16$, который был исследован методами динамического ЯМР. Однако в отличие от соединения **I**, два наиболее стабильных конформера которого имеют одинаковую энергию и соответственно равную заселенность, содержание двух наиболее стабильных конформаций соединения **II** различно. В растворе одновременно существует энергетически более выгодная доминирующая форма и менее энергетически выгодная минорная форма. Соотношение заселенностей доминирующей и минорной для соединения **II** в растворе составляет примерно 75% и 25%.

Исследование радиационно – химических процессов при радиационной обработке молока

Баранова Анна Александровна

Емельянов Виктор Владимирович, Максимова Надежда Евгеньевна, Мочульская Наталья Николаевна,

Кружалов Александр Васильевич

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина

Черешнев Валерий Александрович, д.м.н.

wobbulator@yandex.ru

Исследование ионизирующего излучения (ИИ) с целью сохранения пищевых продуктов началось в 20-х годах прошлого века. С тех пор интерес к радиационной обработке продуктов питания существенно возрос, поскольку при правильном применении ИИ может быть эффективным средством повышения их безопасности, увеличения срока годности, ликвидации алиментарных заболеваний, вызываемых насекомыми и болезнетворными микробами.

Объектом исследования служило молоко питьевое 2,5% жирности. Проводили облучение молока потоком ускоренных электронов с энергией 10 МэВ на ускорителе УЭЛР-10-10С. С целью снижения возможного влияния известного в радиобиологии «кислородного эффекта» на интенсивность накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в облученном молоке, нами были исследованы радиационно-химические превращения компонентов молока, подвергнутого радиационной обработке в среде углекислого газа.

Контрольные образцы молока не подвергали облучению. Оценивали изменение органолептических свойств и титруемой кислотности в градусах Тернера (°Т) согласно действующему в РФ ГОСТу. В облученном молоке определяли содержание начальных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты, триеновые конъюгаты и сопряженные кетодиены) экстракционно-спектрофотометрическим методом И.А. Волчегорского с отдельной регистрацией продуктов в изопропанольной и гептановой фазах экстракта молока, а также конечного продукта ПОЛ малонового диальдегида (МДА) колориметрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой по И.Д. Стальной. Раздельная регистрация продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фракциях экстракта позволяет судить о принадлежности указанных продуктов ПОЛ к гидрофобным (триглицериды, эфиры холестерина, неэтерифицированные жирные кислоты) или амфифильным (фосфолипиды) липидам, соответственно. Концентрацию аскорбиновой кислоты в молоке определяли титриметрическим методом с 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Для оценки радиационно-индуцированных изменений химического состава молока был применен метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Регистрация спектров ЭПР проводилась на ЭПР-спектрометре ELEXSYS E580 фирмы «Bruker Biospin».

Согласно данным, облучение молока в среде углекислого газа в дозах от 1 до 5 кГр приводило к статистически значимому увеличению титруемой кислотности, которая превысила уровень 22°Т, допустимый по действующим нормативам

С увеличением поглощенной дозы облучения происходит накопление диеновых и триеновых конъюгатов, а также сопряженных кетодиенов в изопропанольной фазе экстракта молока. Это указывает на преимущественное повреждение фосфолипидов, составляющих оболочку жировых шариков молочной эмульсии.

В то же время в гептановой фазе экстракта увеличение содержания диеновых конъюгатов в составе гидрофобных липидов было незначительным и не зависело от поглощенной дозы, а содержание триеновых конъюгатов и кетодиенов имело тенденцию к снижению. Это может свидетельствовать об отсутствии значимых изменений гидрофобных липидов, составляющих ядро жировых шариков.

Интегральной характеристикой процессов ПОЛ в молоке при радиационной обработке служит накопление конечного продукта ПОЛ – МДА, признанного токсического агента, способного связывать аминокислоты белков и необратимо нарушать их биологические функции. Содержание МДА при облучении увеличивалось пропорционально поглощенной дозе, максимально до 2 раз, против контроля.

Исследовано содержание аскорбиновой кислоты (АК) в молоке, подвергнутом радиационной обработке. Наблюдаемое дозозависимое снижение содержания АК более чем в 2 раза отражает ее окисление при реализации антиоксидантной активности.

АК является главным водорастворимым антиоксидантом молока и способна перехватывать свободные радикалы в водной фазе, а также восстанавливать радикал токоферола на границе водной и липидной фазы. Однако это не предотвращает накопления продуктов свободнорадикального окисления в облучаемом молоке.

Одной из причин этого может являться то, что молоко характеризуется низким содержанием АК по сравнению с другими продуктами питания.

Проведена радиационная обработка молока. Установлено зависимое от дозы облучения увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов в изопропанольной фазе экстракта молока, увеличение содержания МДА и снижение содержания аскорбиновой кислоты. Предложен подход к исследованию ЭПР-спектров облученного молока, установлены оптимальные условия проведения анализа. Полученные результаты могут послужить основой для выбора оптимальных режимов радиационной обработки молока, а также контроля качества облученного продукта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № проекта 13-03-01100

Список публикаций:

[1] Arvanitoyannis I.S. *Irradiation of food commodities: techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion*. Elsevier, 2010 – 710 p.

[2] Шарпатов В.А. *Радиационная химия биополимеров*. М.: ГЕОС, 2008. 208 с.

Macej O.D., Jovanovic S.T., Denin J.D., Djurd J. *The influence of high temperatures on milk proteins* // *Chem. Ind.* 2002. V.56, № 3. P. 123 - 132.

[3] Блюменфельд А.А., Воеводский В.В., Семенов А.Г. *Применение ЭПР в химии*. Издательство Сибирского отделения АН СССР, Новосибирск, 1962

[4] *Trends in radiation sterilization of health care products*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2008. – 278 p.

ГОСТ 3624-92. *Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности* // *Молоко и молочные продукты. Общие методы анализа*. М.: ИПК Издательство стандартов. 2001. 10 с.

[5] Горячковский А.М. *Клиническая биохимия в лабораторной диагностике*. Изд. 3-е, испр. и доп. Одесса: «Экология». 2005. 616 с.

Установление активных центров пептида PAP248-286, отвечающего за усиление инфекционной активности вируса ВИЧ методами ЯМР спектроскопии

высокого разрешения

Блохин Дмитрий Сергеевич

Филиппов Андрей Васильевич, Клочков Владимир Васильевич

Казанский федеральный университет

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.

dblohin@kpfu.ru

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является одним из самых опасных заболеваний, с момента первого зарегистрированного заражения ВИЧ в 1981 году от ВИЧ-инфекции и СПИДа умерло более 25 миллионов человек. Пандемия ВИЧ-инфекции является одной из наиболее губительных эпидемий в истории человечества.

Несмотря на активное распространение и заражение ВИЧ-инфекцией, сам вирус ВИЧ не обладает большой активностью в лабораторных условиях, и лишь небольшой процент (0,1-0,001%) вирионов способны к репликации в пробирке [1]. Одним из таких факторов является PAP248-286 (PAP – простатическая кислая фосфатаза) (рис.1), пептидный фрагмент предстательной железы кислой фосфатазы. Большая концентрация данного белка в человеческой семенной жидкости.

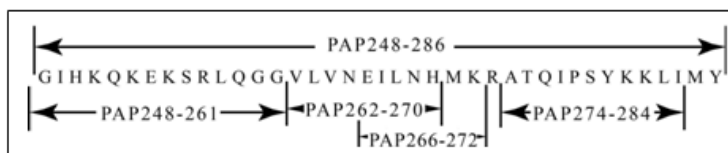


рис.1. Аминокислотная последовательность пептида PAP248-286

Наличие белка PAP248-286 резко увеличивает инфекционную активность ВИЧ. Точный механизм неизвестен, но полагают, что повышение адгезии вируса со специфическим рецептором связывания обуславливается путем сокращения электростатического отталкивания между мембранами вируса и клетки-мишени [2, 3].

Для установления механизма усиления инфекционной активности ВИЧ, с помощью пептида PAP248-286, необходимо знать его сайты-связывания с мембраной и установить активные центры белка. В качестве модели заряженной поверхности биологической мембраны были использованы мицеллы на основе додецилсульфата натрия.

В работе определено пространственное строение фрагментов пептида PAP248-286 в комплексе «пептид-модель поверхности биологической мембраны» (рис.2).

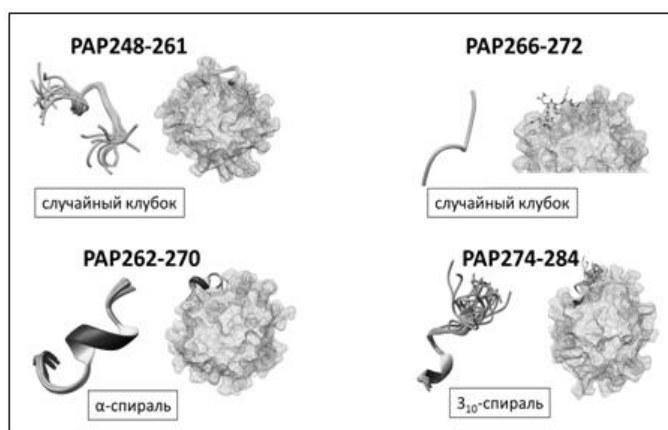


рис.2. Пространственные структуры фрагментов пептида PAP248-286 в комплексе «пептид-модель поверхности биологической мембраны»

Основываясь на анализе установленной конформации отдельных фрагментов PAP248-286 (рис.2), можем предположить, что участки, обладающие вторичной структурой, являются центрами PAP248-286 в процессе взаимодействия с мембраной.

Знание активных центров PAP248-286, участвующих в связывании вириона вируса ВИЧ с мембраной клетки, поможет в создании лекарственных препаратов снижающих вероятность заражения ВИЧ в 1000 раз, за счет препятствования комплексообразования вируса ВИЧ и пептида PAP248-286.

Список публикаций:

- [1] Munch J. et al. // *Cell*. 2007. V. 131 № 6. P. 1059.
 [2] Roan N. R., et al. // *Journal of Virology*. 2009. V. 83. № 1. P. 73.
 [3] Roan N. R., et al. // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. V. 285. № 3. P. 1861.

Дисперсионное уравнение и устойчивость модели потоков ионов при учете нелинейности профиля потенциала на мембране

Васич Ксения Николаевна

Волгоградский государственный технический университет

Грецова Наталья Владимировна

dazdrapermusya@gmail.com

В настоящее время существуют различные подходы к описанию процессов переноса зарядов в биологической клетке и мембране. Достаточное количество данных накоплено в молекулярной биологии, позволяющих моделировать процессы переноса зарядов в функционально значимых органеллах и частях клетки. Создание математической модели процессов, протекающих в клетке, открывает совершенно новые перспективы управления этими процессами. Однако, основной проблемой создания единой модели клетки является иерархия процессов во времени и пространстве, разумеется, при условии полной известности всех составляющих.

За основу берется модель транспорта ионов через мембрану типа «реакция-диффузия» [1], дополненная учетом электромагнитного поля, воздействующего на мембрану, а также учетом нелинейности профиля потенциала. Данная система взята в безразмерном виде [2].

$$\begin{cases} \frac{\partial c_1}{\partial \tau} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial r^2} + B_1 \frac{\partial c_1}{\partial r} \frac{\mu k}{\varphi_0} (\cos(\omega t t_0) \cos(kr) + \sin(\omega t t_0) \sin(kr)) + \\ + B_1 \frac{\mu k^2}{\varphi_0} (\sin(\omega t t_0) \cos(kr) - \cos(\omega t t_0) \sin(kr)) + f(c_1, c_2), \\ \frac{\partial c_2}{\partial \tau} = D_2 \frac{\partial^2 c_2}{\partial r^2} - B_2 \frac{\partial c_2}{\partial r} \frac{\mu k}{\varphi_0} (\cos(\omega t t_0) \cos(kr) + \sin(\omega t t_0) \sin(kr)) - \\ - B_2 \frac{\mu k^2}{\varphi_0} (\sin(\omega t t_0) \cos(kr) - \cos(\omega t t_0) \sin(kr)) + g(c_1, c_2), \\ \frac{\mu k^2}{\varphi_0} (\sin(\omega t t_0) \cos(kr) - \cos(\omega t t_0) \sin(kr)) = -\chi(c_1 - c_2 Z \gamma). \end{cases} \quad (1)$$

На основании данной системы получено дисперсионное уравнение, позволяющее проанализировать устойчивость биологической системы растительного, животного происхождения при воздействии микроволнового излучения низкой интенсивности.

Для проверки устойчивости по Ляпунову система (1) преобразована с помощью последовательного разложения тригонометрических функций системы (1) в ряд Маклорена. При анализе членов разложения показано, что в первом приближении достаточно учесть первые два члена разложения. При учете последующих членов, которые становятся меньше характерного времени пролета ионов через мембрану, можно получить большую точность расчетов при соответствующей постановке задачи, однако при этом заметно усложняются математические операции с дисперсионным уравнением.

Преобразуя первые два уравнения системы (1) с помощью разложения Маклорена и вводя соответствующие отклонения ξ и η от стационарных значений концентраций \bar{c}_1 и \bar{c}_2 , уравнения переписываются в параметрах ξ и η соответственно.

Следуя в дальнейшем методу Ляпунова, ищем решение полученных уравнений, производя подстановку:

$$\begin{cases} \xi(\tau, r) = A e^{p\tau} e^{ikr}, \\ \eta(\tau, r) = B e^{p\tau} e^{ikr}. \end{cases} \quad (2)$$

Используя (2), получаем систему уравнений в новом виде, где последовательно выполняем простейшие арифметические операции, затем составляем определитель из коэффициентов системы при соответствующих членах. Раскрывая определитель, получаем преобразованное дисперсионное уравнение вида:

$$p_{1,2} = \frac{-\zeta \pm \sqrt{\mu^2 - 4\zeta}}{2} \quad (3)$$

Коэффициенты уравнения (3) рассчитываются по следующим формулам:

$$\zeta = D_2 k^2 - S_2 iku(\tau, r) + B_2 \chi Z \gamma + D_1 k^2 + B_1 \chi - S_1 iku(\tau, r) \quad (4)$$

$$\Omega = D_1 D_2 k^4 - D_1 k^3 S_2 iu(\tau, r) + D_1 k^2 B_2 \chi Z \gamma + B_1 \chi D_2 k^2 + \chi S_2 iku(\tau, r) - D_2 k^2 S_1 iku(\tau, r) - S_1 S_2 k^2 u(\tau, r) - S_1 iku(\tau, r) B_2 \chi Z \gamma + B_1 \chi A B_2 \chi Z \gamma + B_1 \chi Z \gamma B_2 \chi. \quad (5)$$

Для анализа дисперсионного уравнения перепишем его в следующем виде, выделив действительную и мнимую части:

$$p_{1,2} = \pm i \sqrt{\Omega - \frac{\zeta^2}{4}} \quad (6)$$

Выражения (6) определяют поведение системы во времени через параметры системы и волновое число k . Справедливо предположить, что знак действительной части $p_{1,2}$, также как и в случае точечных систем, показывает устойчивым или неустойчивым будет исследуемое однородное стационарное решение. В области параметров, где оба $Re p_{1,2} < 0$, решение устойчиво. В случае, если $p_{1,2}$ действительные и положительные, то будем наблюдать неустойчивость типа «узел», если оба комплексные и мнимая их часть больше нуля $Re p_{1,2} > 0$ – неустойчивость типа «фокус», и, в заключение, если p_1 и p_2 имеют разные знаки – неустойчивость типа «седло».

Отдельно можно рассмотреть случай, когда подкоренное выражение уравнения (5) отрицательно, то корни $p_{1,2}$ комплексно сопряженные, и в каждой точке пространства имеют место затухающие колебания переменных вокруг стационарных значений. Если же подкоренное выражение положительно, то $p_{1,2}$ являются действительными и отрицательными, и имеют место бесколебательное стремление переменных к стационарным значениям.

Таким образом, подставив в дисперсионное уравнение реальные параметры, можно говорить о характере поведения системы. На следующем этапе работы предполагается анализ системы с расчетом реальных зон устойчивости.

Список публикаций:

- [1] Лобанов А.И., Старожилова Т.К., Черняев А.П. // Резонансные явления в системах типа «реакция-диффузия», 2002.
 [2] Васич К.Н. Моделирование транспорта ионов через мембрану с учетом нелинейного профиля потенциала в двойном электрическом слое с.43-46 XVIII Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области, г. Волгоград, 5-8 нояб. 2013г. [Текст]: Физика и математика, Филос. Науки и культурологии, Ист. Науки, Права и юриспруденция, Экономика и финансы: тез. докл./ Правительство Волгогр. обл., Совет ректоров вузов, Волгогр. гос. ун-т; редкол.: д-р экон.наук., проф. А.Э. Калинина (отв. ред.) [и др.]. - Волгоград: изд-во ВолГУ, 2013. – 758 с. ISBN 978-5-9669-1247-5

Выявление температурных распределений в акупунктурных точках на поверхности тела человека при помощи тепловизора

Гибашева Ирина Валерьевна

Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского

Потуданская Мария Геннадьевна, к.б.н.

irina-gibasheva@mail.ru

Важной задачей современной медицины является быстрое, качественное, безболезненное для человека выявление патологических изменений организма на ранней, доклинической стадии [1]. Тепловизионный метод обследования, основанный на дистанционном измерении распределения поверхностной температуры тела – один из самых перспективных методов диагностики, однако, он не достаточно активно применяется в лечебно-диагностических учреждениях России [2].

Цель работы заключалась в определении наличия температурных аномалий, относительно окружающего температурного поля, в выбранных акупунктурных точках у здоровых индивидуумов. Задачи исследования: определить температуру в выбранных акупунктурных точках и их окрестностях у здоровых лиц в состоянии покоя, а также при проведении нагрузочных тестов; установить, являются ли достоверно различными температуры в биологически активных точках и их окрестностях с учётом динамического изменения кровотока.

В эксперименте принимали участие здоровые индивидуумы в возрасте от 18 до 20 лет в количестве 8 человек. Регистрация термограмм производили с помощью тепловизора ТКВр-ИФП Свит. Записывали термограммы области шеи и грудной клетки со стороны задней поверхности. Для исследования были выбраны 6 акупунктурных точек заднесрединного меридиана и 4 произвольно выбранные точки в области шеи, не являющиеся точками акупунктуры. Для точного определения локализации биологически активных точек (БАТ) на поверхности тела человека путем электро-рефлекторного воздействия микротокамаи использовали аппарат “Луч-1”. Записанные термограммы обрабатывали с помощью стандартного и оригинального программного обеспечения, разработанного в ОФ ИФП СО РАН [3].

В ходе исследования производили запись двух термограмм: первая записана без особых меток, вторая с термоизолирующими метками выбранных точек. Контрольная группа из 4 индивидуумов была обследована с нанесением меток произвольным образом, т.е. их локализация не совпадала с распределением акупунктурных точек какого-либо меридиана. Термограммы с метками записывались однократно для каждого индивидуума до проведения нагрузочного теста и однократно после проведения нагрузочного теста. Термограммы без термоизолирующих меток записывались последовательно в количестве 10, непосредственно перед нагрузкой, после нагрузочного теста и в период релаксации. После совмещения контуров тела двух термограмм (с метками и без меток) становится возможным определение температуры в точках акупунктуры. Совмещение термограмм необходимо т.к. морфологически невозможно определить локализацию точки акупунктуры на термограмме.

На *рис.1* представлено распределение температур в 1 акупунктурной точке, и ее окрестности с выделенной областью, соответствующей экранированной точке в состоянии покоя до проведения нагрузочных проб.

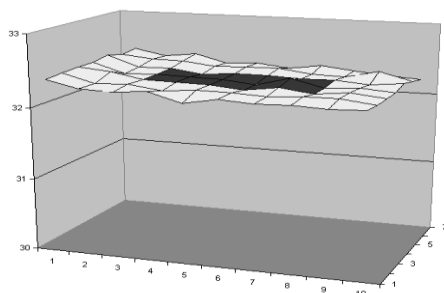


рис.1. Распределение температуры в первой акупунктурной точке и ее окрестности для 1 индивидуума. Область точки выделена темным

На *рис.2* представлены графики зависимости температуры в акупунктурных точках и их окрестностях с учётом стандартных отклонений до и после проведения нагрузочных проб.

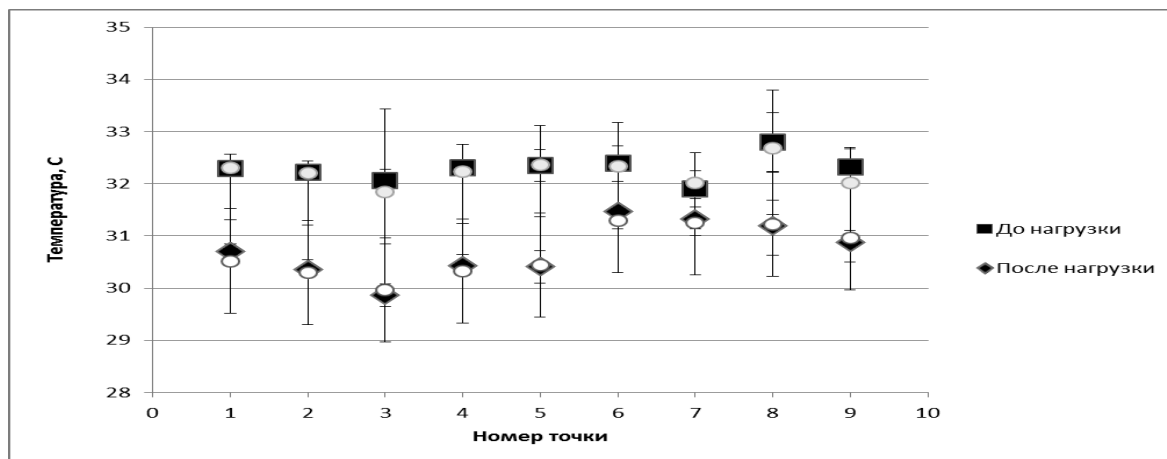


рис.2. Зависимость температуры в акупунктурных точках заднесрединного меридиана и их окрестностях для 1 индивидуума до и после проведения нагрузочных проб. Ряд светлого поля – температуры в окрестностях соответствующих точек

Установлено, что после физической нагрузки изменение температуры носит индивидуальный характер. Также установлено, что температура в акупунктурных точках заднесрединного меридиана и их окрестностях для здоровых лиц является достоверно не различимой как в состоянии покоя, так и после физической нагрузки. Нагрузочные пробы с повышением температуры приводят к более точному совпадению температур в точках и их окрестностях, поэтому не могут применяться для идентификации точек.

Список публикаций:

- [1] Вайнер Б.Г. // Матричное тепловидение в физиологии: Исследование сосудистых реакций, перспирации и терморегуляции у человека. Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2004. С.96.
 [2] / Вайнер Б.Г // Система кровообращения и артериальная гипертония: биофизические и генетико-физиологические механизмы, математическое и компьютерное моделирование. Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2008. С. 252.
 [3] Болотов В.В., Головин И.С., Глотов А.В., Князев Е.В., Макушенко Р.К., Потуданская М.Г. // Методика локализации акупунктурных точек при термографическом обследовании. Материалы IV Международной научно-практической конференции. Ростов-на-Дону. 22-25.09.2011. С. 79.

Исследование зависимости скорости прорастания зерен пшеницы от условий воздействия на них ЭМИ СВЧ

Жирков Александр Валерьевич

Волгоградский государственный технический университет

Никулин Роман Николаевич

jibor@mail.ru

В последнее время всё больше возрастает значимость изучения влияния электромагнитного излучения на живые организмы в связи с появлением нового фактора окружающей среды – антропогенных электромагнитных полей, различные параметры которых существенно отличаются от аналогичных параметров естественных полей.

В данной работе поставлена цель исследования влияния ЭМИ СВЧ на всхожесть и интенсивность роста зерен пшеницы при некоторых различных условиях влияния ЭМИ СВЧ.

В работе были поставлены следующие задачи изучения влияния на прорастание и интенсивность роста зерен пшеницы при:

- их предварительном облучении электромагнитным излучением СВЧ диапазона и предпосевном замачивании в необлученной воде;
- их предпосевном замачивании в воде, облученной ЭМИ СВЧ;
- их предварительном облучении электромагнитным излучением СВЧ диапазона, а также предпосевном замачивании в воде, облученной электромагнитным излучением СВЧ диапазона.

В первой части эксперимента исследовано влияние предварительного облучения электромагнитными волнами низкой интенсивности определённой частоты зёрен пшеницы на их всхожесть и интенсивность роста. Для количественного определения параметров роста применялись относительные параметры всхожести и

интенсивности роста в сравнении с контрольной партией, не подвергавшейся намеренному воздействию электромагнитного излучения. В качестве источника излучения был использован генератор качающейся частоты P2-67, имеющий погрешность частоты, равную одному проценту. В волновод генератора качающейся частоты помещалась пластиковая кювета с зёрнами. Облучение производилось в диапазоне 12,4-16,9 ГГц с интервалом 0,5 ГГц. Продолжительность облучения составляла 25 минут. В течение 12 часов после облучения зёрна были замочены в небольшом количестве воды. Зёрна увлажнялись по мере необходимости. Спустя 36 часов после высадки производился подсчёт количества взошедших зерен. Повторный подсчет производился через 24 часа. После окончательного измерения количества взошедших семян, через 84 часа после высадки зерен производилось измерение длины ростков. Повторные измерения проводились последующие 3 дня с интервалом в 24 часа. Измерение роста производилось линейкой с ценой деления шкалы один миллиметр. Полученные результаты сравнивались с результатами контрольной группы.

В данной части эксперимента установлено, что при облучении зерен пшеницы электромагнитным излучением на частотах 12,4-14,4 ГГц наблюдается увеличение их всхожести в первые три дня, однако на пятый и последующие дни наблюдается значительное падение интенсивности роста. На частотах 14,9-16,9 ГГц наблюдается падение всхожести и интенсивности роста, на протяжении всего времени наблюдения.

Во второй части эксперимента исследовалось влияние предварительного облучения электромагнитными волнами низкой интенсивности воды, которой увлажнялись зёрна пшеницы на всхожесть и интенсивность роста зерен. Условия проведения эксперимента и контроля параметров роста аналогичны первой части эксперимента.

Установлено, что при предпосевном замачивании зёрен пшеницы в воде, облученной ЭМИ, на всём исследуемом частотном диапазоне всхожесть зёрен изменяется незначительно, в то время как наблюдается увеличение интенсивности роста на пятый день после высадки. К седьмому дню стимулирующий характер влияния сохраняется лишь для частоты 12,9 ГГц.

В третьей части исследовалось влияние облучения зерен пшеницы и воды, в которых они были замочены низкоинтенсивными электромагнитными волнами различных частот на всхожесть и интенсивность роста зерен пшеницы. Условия проведения эксперимента, а также контроля параметров роста аналогичны первой части эксперимента.

Установлено, что при данных условиях воздействия ЭМИ СВЧ на зёрна пшеницы на всём исследуемом частотном диапазоне всхожесть зёрен изменяется незначительно. Также наблюдается значительное увеличение интенсивности роста на частотах 12,4-12,9 ГГц, 13,9-14,9 ГГц, 16,4 ГГц на пятый день, после высадки, а также на шестой день для частот 15,9-16,9 ГГц. На седьмой день после высадки характер воздействия излучения перерастает в угнетающий на всём частотном диапазоне. Особенно ярко угнетающий характер выражен на частотах 12,4-13,4 ГГц.

В результате проведенных экспериментов сделаны следующие заключения:

- а) конкретный характер влияния на характеристики роста зерен пшеницы зависит от частоты и условий влияния электромагнитного СВЧ излучения, влияющего на эти зерна;
- б) ЭМИ исследуемого диапазона имеет сначала стимулирующий характер влияния, постепенно угасающий и переходящий в угнетающий;
- в) непосредственное влияние электромагнитного излучения исследуемого частотного диапазона на зерна пшеницы имеет больший спад положительного влияния с течением времени при более низких частотах облучения;
- г) при облучении воды, в которой замачиваются исследуемые семена пшеницы, большее влияние оказывается на интенсивность роста, чем на всхожесть образцов.

Резонансное поглощение электромагнитных волн биотканями

Жураковская Юлия Олеговна

Башкирский государственный университет

Гоц Сергей Степанович, д.ф.-м.н.

Jukkiz@gmail.com

Природа электромагнитных волн известна нам с середины 19 века. В науке и технике много областей, где волновые методы находят применение: для лечения, для роста и развития биологических объектов, а именно растений, для сушки овощей и т.д. При определенных длинах волн процессы могут идти либо быстрее, либо медленнее, либо оставаться постоянными. Наиболее часто метод резонансного поглощения ЭМИ

(Электромагнитное излучение) используется в медицине. В настоящее время в большинстве лечебных заведений дозировка облучения пациента не контролируется, и в ряде случаев это приводит к серьезнейшим осложнениям, в частности лучевая болезнь. Поэтому проблема правильной дозировки так важна.

Целью работы является изучение физических механизмов дозированного резонансного поглощения электромагнитных волн биотканями. В ходе выполнения данной исследовательской работы рассматриваются решения следующих задач:

1. Изучение научно-технической литературы, посвященной рассмотрению физического механизма резонансного поглощения электромагнитных волн
2. Разработка методики дозированного резонансного поглощения электромагнитных волн биотканями
3. Разработка теоретических моделей, объясняющих экспериментальный результат по резонансному поглощению

Электромагнитное излучение - это вид энергии, представляющей электромагнитные волны, возбуждаемые различными излучающими объектами, например, заряженными частицами, атомами, молекулами, а также различными генерирующими устройствами. Электромагнитные волны создаются за счет электрических и магнитных вибраций, возникающих в атомах, т.е. движущимися с ускорением электрическими зарядами и имеют широкий диапазон частот. Скорость распространения электромагнитных волн через различные материалы различна. Примерами электромагнитного излучения являются свет, радиоволны, инфракрасные и ультрафиолетовые, а также рентгеновские и гамма лучи.

Слово "резонанс" в широком смысле означает возрастание отклика колебательной системы на периодическое внешнее воздействие при сближении частоты последнего с одной из частот собственных колебаний системы.

Колебательные системы, которые способны резонировать, могут иметь весьма различную природу. В веществе такими системами могут быть электроны, электронные оболочки атомов, магнитные и электрические моменты атомов, молекул, примесных центров в кристаллах и т.д. Однако во всех случаях общая картина резонанса сохраняется: вблизи резонанса возрастают амплитуда колебаний и энергия, передаваемая колебательной системе извне. Это возрастание прекращается, когда потери энергии (трение, тепловое рассеяние) компенсируют ее прирост.

Каждое вещество имеет свой характерный только для него набор частот собственных колебаний (частотный или энергетический спектр). Собственные частоты могут находиться в широком диапазоне частот (от 10^2 до 10^{22} Гц).

Наиболее удобным и распространенным видом периодического внешнего воздействия является электромагнитное излучение. Частоты электромагнитных волн простираются от 10^2 - 10^8 Гц (радиоволны) до 10^9 - 10^{11} Гц (радиоволны СВЧ), 10^{13} - 10^{14} Гц (инфракрасный свет), 10^{15} Гц (видимый свет), 10^{15} - 10^{16} Гц (ультрафиолетовый свет), 10^{17} - 10^{20} Гц (рентгеновское излучение) и 10^{20} - 10^{22} Гц (g-излучение). В зависимости от диапазона частот используют различные способы генерации (радиопередатчики, лампы накаливания, рентгеновские трубки, радиоизотопы и т.д.) и детектирования (радиоприемники, болометры, фотоэлементы, фотопленки, счетчики Гейгера и т.д.). Таким образом, появились такие разные области физики, как радиоспектроскопия, оптическая спектроскопия, рентгеновская спектроскопия, g-спектроскопия. Хотя во всех этих областях изучают резонансное взаимодействие электромагнитного излучения с веществом, природа такого взаимодействия различна.

В своей работе для исследования влияния резонансного поглощения ЭМИ используется биоткань, на которую направляют электромагнитное излучение. В местах повышения температуры наблюдается резонанс. Для более точных измерений используется болометр (тепловой приёмник излучения). В отличие от многих других детекторов его чувствительность обратно пропорциональна его теплоемкости, которая уменьшается при уменьшении температуры это и обеспечивает чрезвычайно высокую чувствительность устройства.

В данной работе на основе разработанной методики дозированного поглощения ЭМИ биотканями я изучаю и анализирую особенности резонансного поглощения электромагнитных волн биотканями. Особое внимание в работе уделяется рассмотрению существующих проблем с разработкой излучателей на основе этих резонансов.

Исследование протегрина PG-1 в водной среде методом спектроскопии ЯМР

Згадзай Юрий Олегович

Ефимов Сергей Владимирович

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.

yurchubuk@yandex.ru

Протегрин – антимикробный пептид, имеющий форму β -шпильки, стабилизированную дисульфидными мостиками. Аминокислотная последовательность одного из природных вариантов протегрина (PG-1) имеет вид RGGRLCYCRRRFCVVCVGR (молекулярная масса 2,15 кДа). Область R⁹RRF¹² формирует изгиб, при этом оба конца молекулы несут на себе положительный заряд благодаря остаткам аргинина (Arg, R), а центральная часть образована гидрофобными аминокислотами. Благодаря такому строению протегрин, предположительно, внедряется в биологические мембраны, чем и обусловлена его антимикробная активность.

Поведение молекулы протегрина в растворе и в присутствии биомембран представляет особый интерес. Предполагается, что в воде или при связывании на поверхности мембраны образуются димеры [1], внутри же мембран образуются тороидальные поры [2]. Последние исследования показывают, что молекула пептида преимущественно взаимодействует с краями пор или мембран [3]. Между тем, прямые экспериментальные наблюдения взаимодействия протегрина и мембран, а также изменений структуры протегрина при этом весьма малочисленны. Спектроскопия ЯМР высокого разрешения способна пролить свет на этот вопрос. Целью данного исследования является изучение поведения протегрина PG-1 в водной среде и в комплексе с модельной биологической мембраной.

Спектры ЯМР протегрина регистрировали на спектрометре Bruker Avance II (Швейцария) на частоте 500 МГц. Образец представляет собой раствор 0,6 мг PG-1 в смеси 450 мкл соляной кислоты и 50 мкл тяжелой воды D₂O (для стабилизации магнитного поля), pH = 3,55, концентрация HCl - 0,28 мМ. Для соотношения сигналов использовали двумерные эксперименты NOESY и TOCSY. В NOESY проявляются кросс-пики от атомов, близких в пространстве (< 5 Å), в т.ч. от атомов ¹H, связанных двумя или тремя ковалентными связями. Благодаря косвенному спин-спиновому взаимодействию (например, ³J(HN-H α)) пики последнего типа имеют характерную мультиплетную структуру (рис. 1). В спектрах TOCSY проявляется взаимодействие между протонами, связанными цепочкой связей в пределах одного аминокислотного остатка.

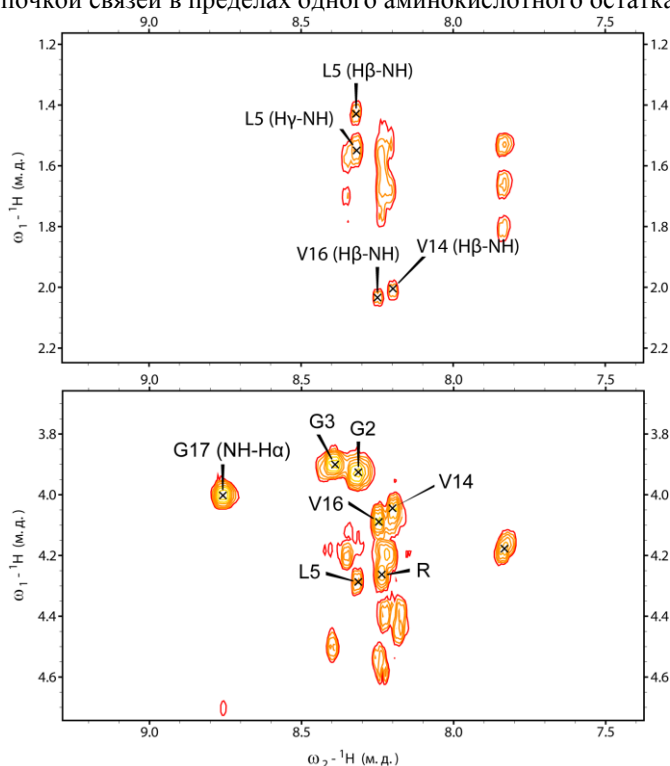


рис. 1. Двумерные спектры ЯМР TOCSY протегрина PG-1 в воде при 27°C (500 МГц)

В среде с pH = 7,4 растворимость пептида оказалась низкой. В спектрах ЯМР ¹H не было сигналов амидных протонов (NH), что можно объяснить быстрым обменом с растворителем [4] и последующим подавлением сигнала, т.к. использовались импульсные программы с подавлением сигнала воды. При добавлении додецилсульфата натрия (14 мг ДСН на 500 мкл, что превышает порог мицеллообразования)

наблюдалось уширение сигналов ароматических протонов остатков Y^7 и F^{12} , что свидетельствует об образовании комплекса. В дальнейшем предполагается записать спектры ЯМР комплекса пептида с модельной мембраной – мицеллой ДСН в более благоприятных условиях (в кислой среде), что позволит изучить пространственную структуру молекулы с помощью методики NOESY.

Список публикаций:

[1] Jang H., Ma B., Nussinov R. // *BMC Struct. Biol.* 2007. V. 7. P. 21.

[2] Su Y., Waring A.J., Ruchala P., Hong M. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. P. 2072.

[3] Lam K.L.H., Wang H., Siaw T.A., Chapman M.R., Waring A.J., Kindt J.T., Lee K.Y.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. P. 194.

[4] Wüthrich K. // *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* New York: John Wiley & Sons. 1986.

Исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов ДНК *p.Phosphoreum*, выращенных в присутствии валина, меченного тритием

Карпенко Полина Александровна

Сибирский федеральный университет

Селиванова Мария Александровна, к.б.н.

Polinakarpenok@gmail.com

Тритий – бета-излучатель, в силу своих радиохимических свойств, легко растворяется в жидкостях, попадает в организм человека, нанося ущерб здоровью. Его особенностью считается высочайшее сродство к водороду, изотопом которого он является. Попадая в живой организм вместе с питательной средой, тритий может привести к дегенеративным изменениям структуры клетки вследствие внедрения в аминокислоты, белки, ферменты, ДНК и РНК. Данные изменения в генетическом материале клетки можно обнаружить методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов ДНК.

Целью данного исследования является обнаружение наличия мутационных изменений в структуре ДНК при росте бактерий в присутствии валина, меченного тритием.

В работе для культивирования морских люминесцентных бактерий использовали полусинтетическую питательную среду, а в качестве источника радиации вводили валин меченный тритием (активность 100 МБк/л). В качестве контроля использовали полусинтетическую питательную среду с альфа-аминокислотой валином (концентрация 0,4 мг/л) в том же объеме (30 мл). Суспензии хранили при 4°C. Далее измеряли интенсивность люминесценции бактерий с помощью биолюминометра ВЛМ 3606 (Конструкторское бюро “Наука”, Красноярск, Институт биофизики СО РАН), для этого через определенный промежуток времени отбирали 10 мкл суспензии бактерий и добавляли в раствор NaCl (3%) в количестве 200 мкл. Для оценки роста использовали оптическую плотность суспензии бактерий при фиксированной длине волны 590 нм с помощью спектрофотометра “Uvicon 943” (Германия). Пробы отбирали на стационарной стадии роста. Получены зависимости оптической плотности, и зависимости интенсивности свечения от времени.

ДНК выделяли с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit. В конце процедуры выделения проводили анализ чистоты состава ДНК на приборе Smart Spec Plus. Выделенную ДНК использовали для получения маркерных ампликонов.

Для получения маркерных ампликонов 16S рРНК использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методика ПЦР заключается в увеличении числа копий фрагментов ДНК за счет комплементарного достраивания матрицы благодаря ферменту ДНК-полимеразы начиная с двух праймеров 1350 R и 500 L. Для проведения реакции был использован амплификатор марки BIO-RAD MJ Mini. В результате были получены целевые фрагменты ампликонов.

Для дальнейшего исследования геномной ДНК использовали метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Его проводили с помощью специальных ферментов эндонуклеаз рестрикции BspFNI, Hae III, Msp I. Рестриктазы разрезали ДНК по определенным последовательностям - сайтам рестрикции с дальнейшим образованием отдельных фрагментов – рестриктов ДНК путем гель-электрофореза. Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции можно было обнаружить по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводили в агарозном геле. После проведения электрофореза и окрашивания геля сравнивали интенсивность свечения полос ДНК в исследуемых и эталонных образцах. Для проведения электрофореза использовано оборудование: Bio-Rad PoverPac. Для анализа рестриктов использовали гель-документирующую систему Bio-Rad Gel Doc XR.

Первичное действие любой радиации начинается с поглощения энергии излучения, что сопровождается возбуждением молекул и их ионизацией. При ионизации органических молекул возникают свободные радикалы, которые, включаясь в протекающие в организме химические реакции нарушают течение обмена веществ процессы жизнедеятельности. На начальной стадии свечение контрольного и радиоактивного образца было приблизительно одинаково, но в контрольном образце активность свечения снижалась быстрее. Таким образом, присутствие трития активировало люминесцентные свойства бактерий.

Анализ на наличие мутаций методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов не показал различий в последовательностях нуклеотидов в рабочих и контрольных пробах. Исходя из этого можно сделать вывод, что в изученном ампликоне гена 16S рРНК бактерии *P. Phosphoreum*, выращенной в присутствии валина, меченного тритием не было выявлено наличие мутационных изменений. Это может быть связано с относительно низкой проникающей способностью излучения и небольшой продолжительностью воздействия радиационной среды, так как биомасса суспензии бактерий была отобрана на стационарной стадии роста.

Использование биолюминесцентной ферментативной тестовой системы для выявления антиоксидантной активности фуллеренола $C_{60}(OH)_n$

Ковель Екатерина Сергеевна

Сибирский федеральный университет

Тарасова Анна Сергеевна, к.б.н.

kkovel@yandex.ru

Фуллеренолы – это полигидроксилированные фуллерены, которые способны растворяться в воде. На основе данных соединений создаются препараты для медицины и фармакологии, они могут быть использованы в качестве компонента композиционных биоматериалов, входят в состав антибактериальных, противогрибковых и противовирусных средств. Перспективными являются производные фуллеренолов, включающие атомы металлов переменной валентности (например, железо) и способные, как предполагается, эффективно влиять на окислительно-восстановительные процессы в биохимических циклах.

Изучение влияния фуллеренолов на физиологические функции, а также выявление детоксицирующей активности этих веществ в растворах редокс-активных токсикантов, являющихся продуцентами активных форм кислорода, является актуальным.

Удобными системами для мониторинга состояния среды являются биолюминесцентные тесты, основанные на ферментативных системах. Тестируемый параметр – интенсивность биолюминесценции. Данные биотесты характеризуются надежностью, высокой скоростью анализа, чувствительностью, возможностью приборной регистрации и количественной оценки токсичности.

Работа связана с изучением воздействия водорастворимого фуллеренола $C_{60}(OH)_n$ на растворы неорганического окислителя – феррицианида калия $K_3[Fe(CN)_6]$ – с использованием биолюминесцентной ферментативной системы двух сопряженных окислительно-восстановительных реакций, катализируемых бактериальной люциферазой и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. Выбор феррицианида калия в качестве модельного токсиканта окислительной природы обусловлен тем, что он стабилен в водных растворах, и восстановление Fe^{3+} до Fe^{2+} представляет собой быстрый, количественный, обратимый и одностадийный процесс.

Полигидроксилированный фуллерен $C_{60}(OH)_n$ был синтезирован и гидроксилирован в лаборатории аналитических методов исследования вещества Института Физики СО РАН.

Ранее [1, 2] было показано, что в растворе феррицианида калия наряду со снижением относительной интенсивности биолюминесценции ферментативной системы (I^{rel}) появляется период задержки свечения (T). Известно, что задержка свечения в данной системе связана с процессами конкуренции окислителей в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях.

Для характеристики токсичности раствора феррицианида была выбрана его эффективная концентрация ($EC-50$), ингибирующая биолюминесценцию на 50%, равная $2 \cdot 10^{-4} M$.

Изменение общей токсичности растворов под действием фуллеренола оценивали с помощью коэффициентов детоксикации K_{GT} :

$$K_{GT} = \Gamma_{(T+\Phi)}^{rel} / \Gamma_T^{rel}, \quad (1)$$

где $I_{(T+\Phi)}^{rel}$ и I_T^{rel} – относительная интенсивность биолюминесценции в растворе модельного токсиканта феррицианида калия соответственно в присутствии и отсутствии фуллеренола.

Изменение окислительной токсичности растворов под действием фуллеренола оценивали с помощью коэффициентов детоксикации K_{OxT} :

$$K_{OxT} = T_T^{0,5} / T_{(T+\Phi)}^{0,5}, \quad (2)$$

где $T_T^{0,5}$ и $T_{(T+\Phi)}^{0,5}$ – времена достижения половины максимального значения биолюминесценции в растворе окислителя в отсутствии и присутствии фуллеренола соответственно.

Величины коэффициентов $K_{GT} > 1$ и $K_{OxT} > 1$ соответствуют детоксикации раствора, $K_{GT} = 1$, $K_{OxT} = 1$ – отсутствию эффекта, $K_{GT} < 1$, и $K_{OxT} < 1$ – увеличению токсичности.

На рис. 1 А и 1.Б представлены зависимости K_{GT} и K_{OxT} от концентрации фуллеренола.

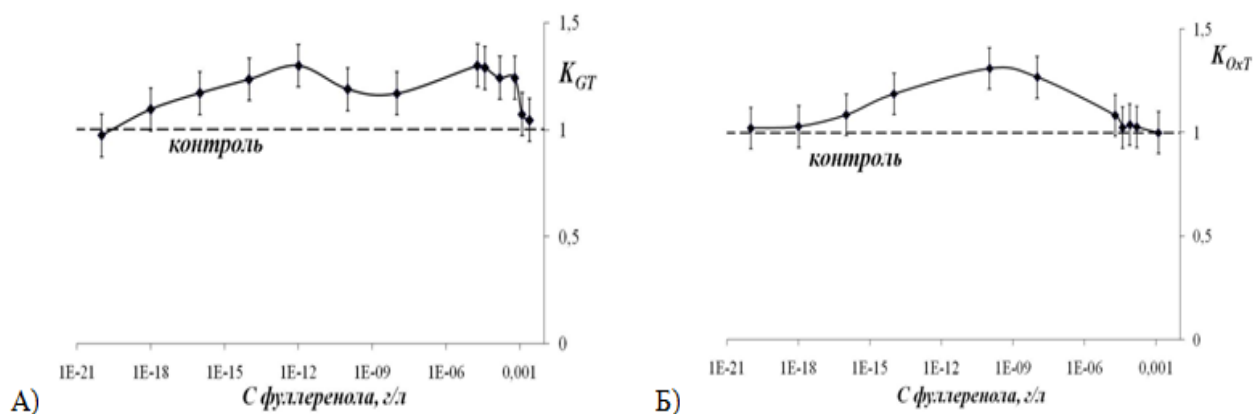


рис.1. Зависимость коэффициентов детоксикации (А) K_{GT} , и (Б) K_{OxT} раствора феррицианида калия ($EC_{50} = 2 \cdot 10^{-4} M$) от концентрации фуллеренола $C_{60}(OH)_n$

Данные, представленные на рис.1А, показывают, что воздействие фуллеренола низких концентраций ($< 10^{-3}$ г/л) приводит к уменьшению общей токсичности раствора феррицианида калия ($K_{GT} > 1$). Снижение окислительной токсичности ($K_{OxT} > 1$) наблюдали при использовании концентраций фуллеренола менее $2 \cdot 10^{-5}$ г/л (рис.1Б). Причиной снижения токсичности раствора феррицианида калия, возможно, является образование комплексов окислитель-фуллеренол. В интервале концентраций фуллеренола $10^{-3} - 4 \cdot 10^{-5}$ г/л период задержки свечения практически не изменялся ($K_{OxT} \approx 1$, рис.1Б).

На рис.1 не приведены данные для концентраций фуллеренола $> 2,5 \cdot 10^{-3}$ г/л, т.к. эти концентрации тушат биолюминесценцию ферментативной системы в результате, вероятно, «эффекта оптического фильтра» (абсорбции люминесценции), который возникает при больших концентрациях $C_{60}(OH)_n$ в связи с окрашенностью его насыщенного раствора.

Таким образом, в работе показано, что для эффективной детоксикации водного раствора неорганического модельного окислителя (феррицианида калия) концентрации $C_{60}(OH)_n$ должны составлять не более 10^{-3} г/л в растворе.

Список публикаций:

- [1] A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva, *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1013-1017 (2011).
- [2] A. S. Tarasova, S. L. Kislak, E. S. Fedorova, A. M. Kuznetsov, O. A. Mogilnaya, D. I. Stom, N.S. Kudryasheva, *J. Photochem.Photobiol. B.* 117 164 (2012).

Образование комплекса полипептидного гормона инсулина с моделью биологической мембраны по данным спектроскопии ЯМР

Колосова Ольга Андреевна

Усачев Константин Сергеевич, Клочков Владимир Васильевич

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Клочков Владимир Васильевич, д.х.н.

kolosova.olga11@gmail.com

Инсулин человеческий – полипептидный гормон, который продуцируется β -клетками эндокринной части поджелудочной железы. Его молекулярный вес ~ 5800 Да и его структура состоит из двух пептидных цепей α и β соединенных друг с другом межцепочечными дисульфидными связями (рис. 1А).

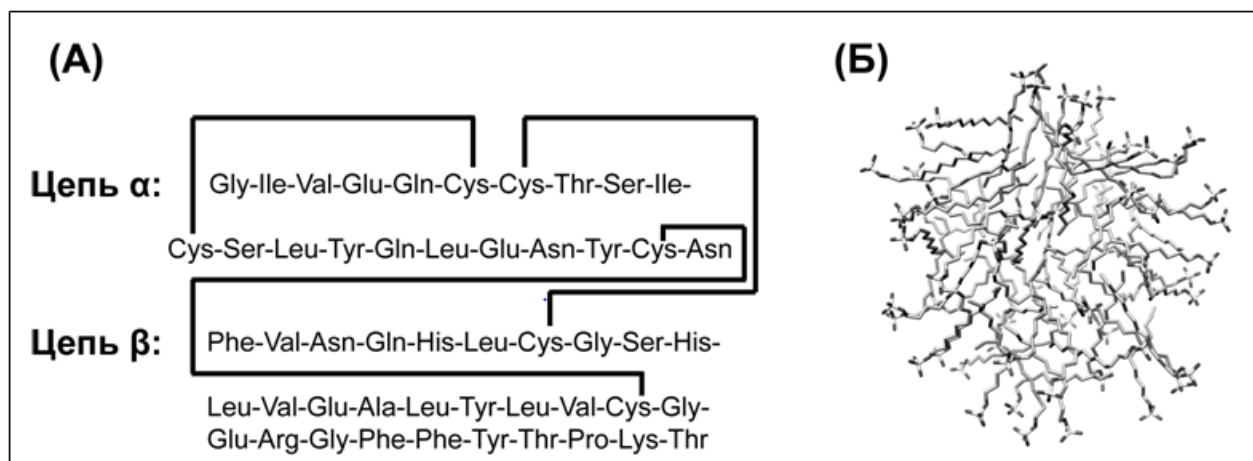


рис. 1. (А) Аминокислотная последовательность инсулина человеческого. (Б) Мицелла ДСН

Инсулин обеспечивает потребности клеточного гомеостаза, стимулирует синтез, тормозит распад жиров. Инсулин, как и другие гормоны, осуществляет своё действие на клетки через соответствующий белок-рецептор. По данным двумерных экспериментов ^1H - ^1H TOCSY и ^1H - ^1H NOESY ЯМР в растворе инсулина с мицеллами додецилсульфата натрия (ДСН) (рис. 1Б), заряженная поверхность которых может быть использована как модель поверхности мембраны [1], было установлено образование комплекса «инсулин-мицелла ДСН», что может иметь значение для изучения молекулярного механизма и функций данного гормона.

Инсулин человеческий (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 10 мМ фосфатном буфере (90% H_2O +10% D_2O) pH=7,4 с добавлением 0,02% NaN_3 и 100 мМ мицеллярном растворе дейтерированного додецилсульфата натрия (полнота замещения протонов на ядра дейтерия 98%). Концентрация пептида в растворе составляла 3,5 мг/мл. Исследуемый пептид растворяли в мицеллярном растворе непосредственно перед проведением экспериментов ЯМР.

Регистрацию одномерных и двумерных (^1H - ^1H) спектров ЯМР в растворах проводили на ЯМР-спектрометре AVANCE II-500 (Bruker Biospin, Faellanden, Швейцария) (500 МГц (^1H)) при температуре 293 К. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H использовали подход, основанный на совместном применении TOCSY и NOESY экспериментов [2].

В спектрах ^1H - ^1H NOESY полипептидного гормона инсулина в растворе с мицеллами ДСН и в растворе фосфатного буфер, в растворе с мицеллами наблюдалось значительное увеличение кросс-пиков, что является свидетельством увеличения молекулярной массы исследуемого вещества за счет образования комплекса «пептид-мицелла», что может иметь значение для изучения молекулярного механизма и функций данного гормона.

Список публикаций:

[1] Usachev K.S., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Klochkov V.V. // *European Biophysical Journal*. 2013. V.42. P. 803-810.

[2] Blokhin D.S., Efimov S.V., Klochkov A.V., Yulmetov A.R., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Aganov A.V., Klochkov V.V. // *Applied Magnetic Resonance*. 2011. V.41. P.267.

Математическая модель электрической и механической функции одномерного волокна сердечной мышцы

Медведев Кирилл Андреевич

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина

Курсанов Александр Геннадьевич

cirili@mail.ru

Выяснение молекулярно-клеточных механизмов возбуждения и сокращения сердечной мышцы является основой для понимания ее функционирования в норме и патологии, а также для диагностики, прогноза и рациональной терапии заболеваний сердца. Поскольку целое сердце – чрезвычайно сложный объект, в рамках которого выяснение фундаментальных закономерностей взаимодействия между неоднородными клетками миокарда не представляется возможным, потребовалась разработка простейших и вместе с тем информативных математических моделей миокарда.

Целью данной работы является создание математической модели активного электромеханического поведения одномерной сердечной мышцы для воспроизведения проведения электрического возбуждения и сократительной активности миокарда. Модель должна адекватно воспроизводить и объяснять феномены, наблюдаемые в физиологических экспериментах на мышечных препаратах или в интактном сердце.

Разработанная нами математическая модель волокна основана на континуальном описании миокардиальной ткани. С одной стороны, миокардиальная ткань рассматривается как сплошная среда. С другой стороны, каждой точке этой среды ставится в соответствие кардиомиоцит, функция которого детально описывается математической моделью электромеханической активности одиночной клетки миокарда, разработанной в лаборатории математической физиологии ИИФ УрО РАН [1].

Схема модели (рис.1) включает реологическую схему кардиомиоцита, как элементарного сократительного звена в модели ткани. В этой схеме представлены активный сократительный элемент (CE_x) модели кардиомиоцита – саркомер, а также пассивные упругие (PE_x , SE_x) и вязкий элемент (VS_x), определяющие не только пассивно-упругие свойства клетки, но и влияющие на его активную механическую функцию [2].

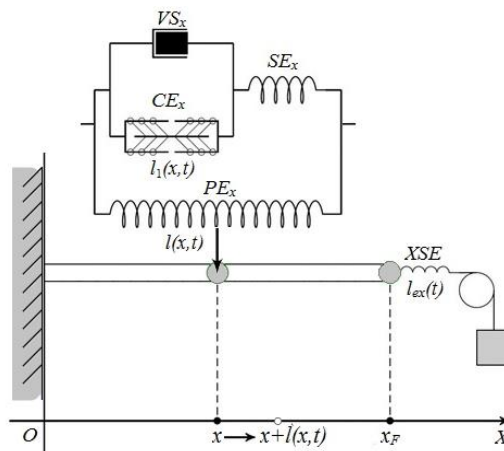


рис.1. Одномерный многоклеточный препарат миокардиальной ткани

Особенностью нашей модели является подробное описание функции сократительных белков и их кальциевой активации. Эти механизмы обеспечивают воспроизведение в рамках модели широкого круга экспериментальных данных о влиянии механических условий сокращения миокарда (в том числе, начального растяжения саркомеров, нагрузки на миокард и др.) не только на собственно механическую активность сердечной мышцы, но и на кинетику внутриклеточного свободного кальция и генерацию потенциала действия (ПД) (феномены механо-электрической обратной связи в миокарде).

Электрическая волна возбуждения волокна описывается уравнением реакционно-диффузионного типа (1) для распространяющегося в среде потенциала действия.

$$\frac{\partial V(x,t)}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 V(x,t)}{\partial x^2} - \frac{1}{C_m(x)} \cdot \sum i_{ion}(x,t). \quad (1)$$

где $V(x,t)$ – потенциал действия; D – коэффициент диффузии; $C_m(x)$ – емкость мембраны; $i_{ion}(x,t)$ – ионные токи, проходящие через мембрану клетки.

Континуальная модель однородного мышечного волокна воспроизводит: распространение электрической волны возбуждения вдоль волокна с физиологически адекватной скоростью (0.46 м/с); процессы укорочения-растяжения и генерации силы в сегментах волокна по ходу распространения волны возбуждения; изменение концентраций основных внутриклеточных ионов, ответственных за изменение мембранного потенциала и сократительную функцию в клетках при различных режимах сокращения (рис.2).

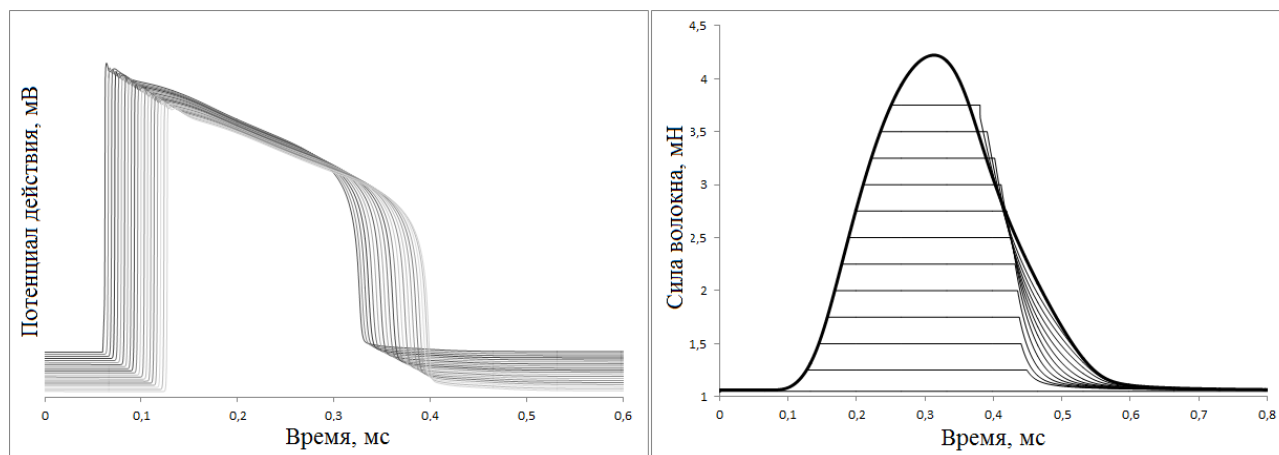


рис.2. Фиксируемые ПД в клетках волокна (слева). Сила волокна в изометрическом режиме сокращения и в изотоническом режиме сокращения при различных постнагрузках (справа).

Важным звеном модели является то, что она позволяет определить связь между длинами на микроуровне (клетка) и макроуровне (ткань). Поэтому внутренние длины клеток и их непрерывное изменение учтены в модели. Построенные соотношения между макро- и микродлинами позволяют перенести влияние механической активности миокарда на электрическую функцию с клеточного уровня на уровень сплошной среды.

Список публикаций:

- [1] T. B. Sulman, et al., *Bulletin of Mathematical Biology*, 2008, 70(3), 910-49.
 [2] L. V. Katsnelson, et al., *Journal of Theoretical Biology*, 2011, 272(1), 83-95.

Морфология и микроэлементный состав желчных камней: исследования рентгеноспектральными методами и методами электронной микроскопии

Михайлова Татьяна Андреевна

Клименко Ольга Владимировна

Южный федеральный университет

Яловега Галина Эдуардовна, д.ф.-м.н.

tanymisha@mail.ru

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) — заболевание гепатобилиарной системы, которое связано с образованием камней в желчном пузыре и/или в желчных протоках. Формирование конкрементов в неизменённых жёлчных путях является началом патологического процесса, который на протяжении длительного времени или в течение всей жизни может не вызывать значительных функциональных расстройств и клинических проявлений. В настоящее время острый холецистит (ОХ) является одним из наиболее распространенных острых хирургических заболеваний органов брюшной полости [1]. Роль неорганических веществ в образовании желчных камней на данный момент мало изучена как Российскими учеными, так и зарубежными, в отличие, например, от микроэлементного состава нефролитов [2]. Возможно, это связано с тем, что в настоящее время механизм камнеобразования при ЖКБ связывают с органическими веществами желчи (холестерином, билирубином, муцином). В качестве исследуемых образцов были использованы желчные камни пациентов, с диагнозом хронического калькулёзного холецистита, извлеченные в хирургическом отделении Ростовского государственного медицинского университета. В работе была исследована морфология поверхности и внутренних зон камней методом сканирующей электронной микроскопии, а также микроэлементный состав всех отобранных образцов методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии с использованием микроскопа LEO 1560 института Нанометровой оптики и технологии и станции синхротронного излучения КМС-2 (Берлинский Центр материалов и энергии имени Гельмгольца). Измерения были проведены в диапазоне энергии ионизации от 1 до 12 кэВ, что соответствует диапазону элементов от Na до Br. Как известно, существует 4 вида камней: холестериновые, известковые, пигментные (билирубиновые) и

смешанные камни. К холестериновым камням относятся 70-90 % всех конкрементов желчного пузыря, состоят главным образом из холестерина. Они имеют желтый или белый цвет, гладкую поверхность, лучистое строение на разрезе (рис.1а). Черные пигментные камни состоят из билирубината кальция и других соединений билирубина. Основной их составляющей является кальций. Подавляющее число камней имеют смешанный состав (рис.1б) с преобладанием холестерина (они составляют около 80% всех камней). Так же отличительной особенностью смешанных камней является наличие в составе фосфора Р, придающего этим камням более темный, черный цвет. В нашей работе был исследован ряд камней относящихся к разряду холестериновых, смешанных и пигментных (рис.1с).

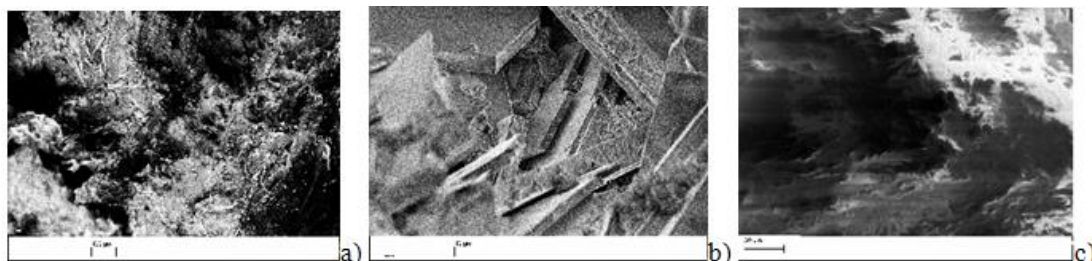


рис.1 (а) Микрофотография внутренней области гомогенного холестеринового камня, смешанного (б) и пигментного (с) камней, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа

В результате проведенных исследований было установлено, что в элементный состав камней всех видов могут входить 3d элементы Mn, Fe, Ni, Cu, Zn с той или иной концентрацией элементов. В качестве вариативных элементов выступают Bi, Br, As, Cr, что может быть следствием проводимого лечения пациентов или среды обитания. Содержание металлов на поверхностных слоях холестериновых камней выше по сравнению с внутренней частью. По данным электронной микроскопии внутренняя часть смешанных камней хорошо проводит ток, что свидетельствует о присутствии в ней атомов металлов, которые входят в составе ядра камня. Содержание металлов на поверхности пигментных камней выше, чем во внутренней части, о чем свидетельствует высокая электропроводность.

Список публикаций:

- [1] Борисов, А.Е., Земляной, В.П., Левин, Л.А. и др. Современное состояние проблемы лечения острого холецистита / Вестник хирургии.-2001.-т.180, №5.-с. 92-95.
 [2] Э. В. Сокол, Е. Н. Нигматулина, А. Ю. Чиглицев, Д. Ю. Нохрин, Н. В. Максимова, А. В. Дарьин, К. В. Золотарев. - Микроэлементный состав нефролитов как маркер воздействия окружающей среды на человека. Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геоэкология - № 2, Март-Апрель 2007, С. 151-163.

Влияние острого гамма-облучения самцов крыс в дозе 0,5 Гр на психофизиологическое развитие их потомства

Панфилова Виктория Викторовна

Колганова Ольга Ивановна

Медицинский радиологический научный центр Минздрава России

Жворонков Леонид Петрович, д.м.н.

whiskas04@yandex.ru

В последние годы стала актуальной проблема выяснения физиологической полноценности внешне здоровых детей – потомков отцов, облученных в дозах, не приводящих даже к временной стерильности. Данные по этой тематике противоречивы. В ряде работ при психологическом обследовании детей ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС было выявлено некоторое снижение интеллекта, даже у детей без выраженных пороков развития. Однако в других работах такие эффекты не выявлены. Одним из способов получения достоверной информации по этому направлению являются экспериментальные исследования на животных. Важным показателем психофизиологической неполноценности потомства могут являться изменения в когнитивных функциях мозга.

Целью данной работы являлось изучение влияния острого гамма-облучения в дозе 0,5 Гр крыс линии Вистар на условно-рефлекторную деятельность их потомства первого и второго поколений.

Самцов крыс линии Вистар облучали в дозе 0,5 Гр на гамма - установке "Луч" при мощности дозы 20,0 Гр/ч и спаривали с интактными самками через разные интервалы времени после облучения. Для того, чтобы в оплодотворении участвовали облученные сперматозоиды, самцов подсаживали к самкам на 5 сутки после облучения из расчета 2 самца на 5 самок. Для участия в оплодотворении облученных сперматид самцов подсаживали к самкам на 18 сутки после облучения, а для участия облученных сперматоцитов – на 34 сутки, а

для участия в оплодотворении облученных сперматогоний - через 3 месяца после облучения. Контрольную группу составляли интактные самцы и самки, которые находились в идентичных с подопытными крысами условиях содержания. Для получения второго поколения животных из первого поколения спаривали с интактными животными. Изучение психофизиологического развития крыс проводилось после достижения ими возраста трех месяцев. Из числа выживших потомков отбирали клинически здоровых животных без выраженных пороков развития, и оценивали у них когнитивные (памятные) функции мозга по способности к выработке, запоминанию и последующему воспроизведению условного рефлекса избегания (УРИ). В экспериментах использовали стандартную методику обучения крыс в челночной камере шаттл-бокс. Данный метод позволяет судить о таких элементах высшей нервной деятельности, как ассоциативное мышление, память, закрепление условных связей и воспроизведение выработанного навыка. Крыс тестировали в трехканальной камере, предъявляя им следующую последовательность сигналов: свет + звук (условный сигнал) – 4 сек; болевое электрическое раздражение (безусловный сигнал) – с 4 по 12 сек; пауза – 20 сек. За одно тестирование крысам предъявляли по 50 сочетаний условного и безусловного раздражителей. Животных тестировали два раза с интервалом в два дня.

При анализе выработки и воспроизведения УРИ использовали ряд показателей, отражающих конечную результативность либо характеризующих скорость обучения. К интегративным критериям относили: 1) число нанесённых током ударов до регистрации первого УРИ – лаг-фаза обучения; 2) общее число УРИ за сессию, из них быстрых – латентный период до 2.5 с; 3) количество перебежек в другой отсек после удара током, в том числе быстрых – латентный период менее 5 с; 4) число отказов (отсутствие перебежек даже при электрокожном подкреплении); 5) наличие крыс, имеющих серии из пяти и более УРИ подряд (критерий оценки консолидации памятного следа); 6) среднее по группе значение латентного периода реакции избегания либо перебежки.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ряда методов параметрической (критерии Т-Стьюдента и Фишера) и непараметрической статистики (критерии Кси-квадрат, Х- Ван дер Вардена, U- Вилкоксона-Манна-Уитни). При анализе динамики обучения получали соответствующие уравнения линейной регрессии с коэффициентами, отражающими наклон кривой, а также расчетные начальные параметры. Стандартные ошибки коэффициентов давали возможность оценить различия между кривыми. Значимость различий считалась достаточной при $p < 0,05$. Все приведенные статистические подходы реализованы в комплексной компьютерной программе, которая использовалась при обработке данных.

Установлено, что у потомства первого поколения значительно нарушены выработка и закрепление условных рефлексов в подопытной группе сперматогонии. Причем эффект на группе самок был более выражен. У них была снижена способность к обучению – условные рефлексы начинали вырабатываться позже, чем у контроля, снижалось число крыс с сериями условных рефлексов, что свидетельствовало о нарушениях запоминания «урока» в процессе обучения и неустойкости выработанного рефлекса избегания. У потомков второго поколения, по сравнению с потомками первого поколения, зафиксированные нарушения условно-рефлекторной деятельности были менее выражены, но все же сохранялись в подопытной группе сперматогоний. При этом результативность тестирования по общему количеству УРИ у подопытных животных практически на уровне контрольных животных. Но вот показатели скорости обучения несколько снижены. Также отмечены нарушения в кратковременной и долговременной памяти, подопытные животные начинали второе тестирование с более низких позиций, чем контрольные животные, то есть они не запомнили урок с первого тестирования.

По результатам проведенного исследования потомства облученных самцов крыс в дозе 0,5Гр можно сделать вывод о том, что облучение в этой дозе вызывает повреждение генетического материала в половых клетках самцов, и эти нарушения сохраняются и передаются их потомству первого поколения и в меньшей степени второго поколения.

Влияние сероводорода на Ca^{2+} -зависимую гиперполяризацию мембраны эритроцитов человека

Розенбаум Юлия Андреевна

Мосунов Иван Николаевич

Сибирский государственный медицинский университет

Петрова Ирина Викторовна, д.б.н.

julia-rozz@mail.ru

В последние годы внимание исследователей привлекают газовые трансмиттеры – оксид азота, оксид углерода, сероводород, которые образуются в организме человека и животных и регулируют ряд физиологических функций. Мишенями этих молекул зачастую выступают ион-транспортные системы мембран клеток. В качестве модели для изучения механизмов переноса ионов через биологическую мембрану могут

служить эритроциты. Мембрана эритроцитов содержит Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, которые играют важную роль в эриптозе – программируемой гибели эритроцитов. Известно, что при ряде патологий время жизни эритроцитов снижено.

В связи с этим изучение влияния различных физических и химических факторов на ион-транспортные системы клеток представляется весьма актуальным.

Целью настоящей работы было исследование влияния газового транмиттера сероводорода на изменения мембранного потенциала эритроцитов, вызванного активацией Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов.

Задачи исследования:

Изучить влияние различных концентраций донора сероводорода гидросульфид натрия (NaHS) на амплитуду гиперполяризации мембраны эритроцитов, обусловленной открыванием Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов.

Изучить роль $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта в эффектах сероводорода.

Для исследования Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям рН среды инкубации в присутствии протонофора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала E_m как $E_m = RT/F(\text{pH}_i - \text{pH}_o)$. Здесь pH_i и pH_o – значения рН цитоплазмы и среды инкубации, соответственно [Орлов С.Н., Петрова И.В. с соавт., 1992]. Эксперименты проводились по следующему плану. Для получения гиперполяризационного ответа к 4,75 мл среды инкубации (среда N), содержащей 150 мМ NaCl , 1 мМ KCl , 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы и 10 мкМ CaCl_2 , добавляли 0,25 мл упакованных эритроцитов. Через 5 мин инкубации при 37°C и постоянном перемешивании добавляли протонофор Cl-CCP до конечной концентрации 20 мкМ и спустя 2 мин добавляли 0,5 мкМ Ca^{2+} -ионофора A23187. Добавление кальциевого ионофора A23187 к суспензии клеток, содержащей хлорид кальция, приводило к выходу ионов калия и развитию гиперполяризационного ответа (ГО) мембраны эритроцитов, что находило свое отражение в изменении рН суспензии.

В работе использована кровь здоровых доноров. Кровь забиралась из локтевой вены утром натощак в пробирки с гепарином (25 ед/мл крови). После центрифугирования (1000g, 5 мин, 4°C) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты дважды промывали 3 частями изотонического раствора NaCl (150 мМ).

В качестве донора сероводорода был использован гидросульфид натрия, который в водной среде диссоциирует на Na^+ и HS^- .

Добавление в среду инкубации эритроцитов NaHS в концентрациях от $1\ \mu\text{M}$ до $10\ \mu\text{M}$ не вызывало изменения амплитуды ГО. Увеличение концентрации NaHS от $1\ \mu\text{M}$ до $150\ \mu\text{M}$ приводило к закономерному снижению амплитуды ответа, что свидетельствует о подавлении активности Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов. Причиной полученного эффекта может быть влияние H_2S на белки ионного канала, что снижает его проводимость. Однако не исключаем, что сероводород действует на другие ион-транспортные системы, обеспечивающие поддержание градиента ионов калия, что необходимо для работы Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов. Одной из таких систем является $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорт. Внесение 5 мкл $0,1\text{M}$ блокатора $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорта буметанида в среду инкубации эритроцитов приводило к снижению амплитуды ГО, что объясняется уменьшением градиента ионов калия. Совместное внесение буметанида и NaHS в среду инкубации привело к следующим результатам. Если концентрация NaHS в среде инкубации эритроцитов составляла $1\ \mu\text{M}$ – $10\ \mu\text{M}$, то амплитуда ГО не изменялась. Увеличение концентрации гидросульфида натрия до $100\ \mu\text{M}$ в присутствии буметанида приводило к росту амплитуды по сравнению с данными в отсутствие блокатора $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорта. Дальнейшее увеличение концентрации гидросульфида натрия в среде инкубации в присутствии блокатора буметанида подавляло развитие ГО так же, как и в отсутствие блокатора (*рис. 1*).

Известно, что $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспортер осуществляет одновременный перенос ионов натрия, калия и хлора, причем направление переноса может изменяться. Возможно в присутствии сероводорода изменяется работа этой транспортной системы. Это, в свою очередь, модулирует градиент ионов калия, являющегося движущей силой для переноса K^+ через Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы.

Таким образом в настоящем исследовании установлено, что сероводород изменяет перенос ионов калия через Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы мембраны эритроцитов. Одной из причин этого может быть непосредственное влияние сероводорода на белки ионного канала. Другой причиной может быть воздействие сероводорода на другие ион-транспортные системы клетки, в частности, $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -котранспорт, которые создают градиент ионов калия на мембране клеток.

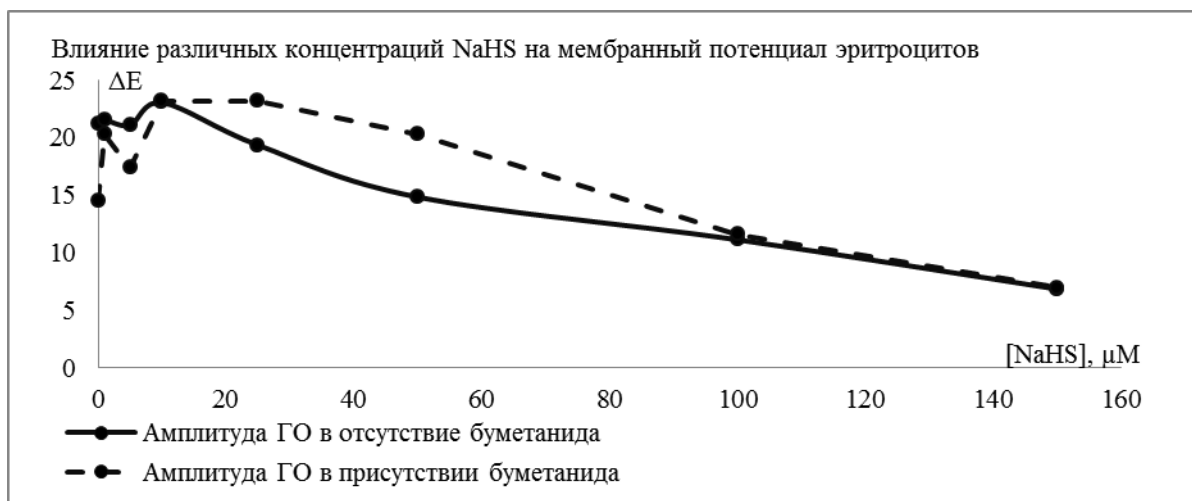


рис.1. Влияние донора сероводорода гидросульфид натрия на амплитуду гиперполяризационного ответа эритроцитов.

Заключение: Таким образом сероводород может непосредственно влиять на белки Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов, уменьшая его проводимость, либо через модуляцию активности $Na^+K^+2Cl^-$ -котранспорт.

Список публикаций:

- [1] Орлов С.Н. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала [Текст], Биологические мембраны, № 9, 885-903, 1992.
 [2] Philipp A. Lang et al. Role of Ca^{2+} -activated K^+ channels in human erythrocyte apoptosis, Am J Physiol Cell Physiol, 285, 1553-1560, 2003.

Разработка методик приготовления образцов молекул ДНК с целью их успешного наблюдения с помощью атомно-силового микроскопа

Симанов Евгений Владимирович

Башкирский государственный университет

Шарипов Талгат Ишмухамедович, к.ф.-м.н.

Simanov19911121@mail.ru

В настоящее время, в связи с неблагоприятной экологической обстановкой, развитием многих видов заболеваний, острым является вопрос быстрой и точной диагностики параметров организмов и окружающей среды. Понимание процессов происходящих в клетках, тканях живых организмов и их интерпретация является важной задачей. Удобным, перспективным методом её решения может быть использование биологических микрочипов (биочипов).

Биочип - новый метод параллельного многопараметрического анализа биологического материала. Уникальной особенностью биологических чипов является огромный объем данных, которые они производят, высокая точность проводимых тестов, а также незначительное, по сравнению с альтернативными тестами, время, требующееся на анализ и интерпретацию результатов.

В данной работе изучены технологии изготовления биологических чипов, способы препарирования подложек, а также методы детектирования информационного сигнала и его интерпретация. На сегодняшний день в мире существует множество типов биочипов, различающихся как по области применения, так и по технологии изготовления. Одним из видов биочипов является ДНК-чип. Для интерпретации результатов полученных с помощью ДНК чипов на данный момент широко используют метод математической обработки люминесцентного изображения анализируемого биологического микрочипа. Также эффективным инструментом детектирования ДНК чипов является атомно-силовая микроскопия. Наблюдение характеристик ДНК на поверхности подложки имеет важное значение в проектировании ДНК чипов. Кроме того немаловажной деталью является прикрепление молекул ДНК-зондов к поверхности чипа. Все стадии приготовления образца необходимо контролировать с помощью силовой зондовой микроскопии, поскольку она является эффективным высокоразрешающим методом диагностики при изготовлении ДНК чипа и детектировании информационного сигнала с него.

В данной работе мы исследовали способы препарирования образца для определения наилучшей методики прикрепления зонда к поверхности, а также оптимальное расположение молекул на поверхности для успешного анализа. Объектом исследования были подложки с нанесенными на них молекулами ДНК. В качестве подложки использовали свежий скол слюды и высокоориентированный пиролитический графит. Образцом служил водный раствор одноцепочечных молекул ДНК Poly (C) – Poly (G). Использовали деионизованную воду MilliQ.

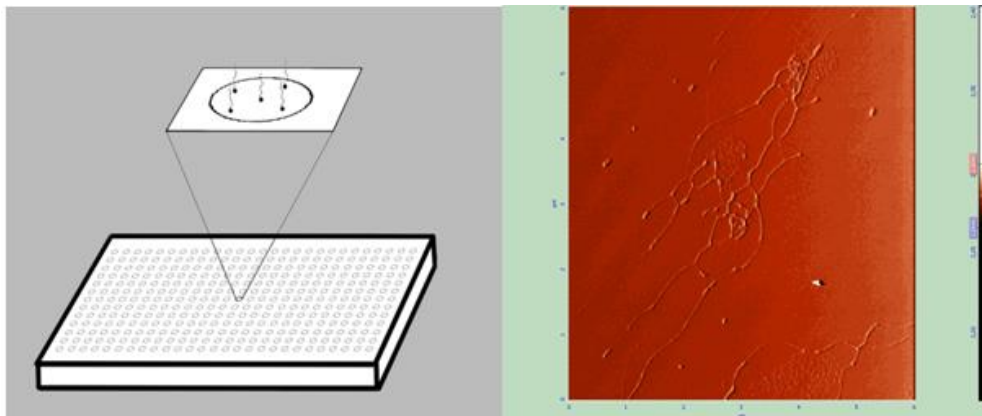


рис.1. Биочип с закреплёнными на нем молекулами ДНК рис.2. АСМ изображения подложки с молекулами ДНК

Готовили образцы по разным методикам: 1) Наносили каплю образца перпендикулярно на подложку; 2) Наносили каплю образца под некоторым углом на подложку; 3) Наносили каплю образца перпендикулярно на подложку, затем обдували

Эти образцы исследовали с помощью АСМ, получили АСМ- изображения и интерпретировали их. По нашему мнению наиболее качественными получаются АСМ- изображения подложек, приготовленных по второй методике: нанесение образца на подложку под углом.

Список публикаций:

[1] Симанов Е. В. // *Фундаментальная математика и её приложения в естествознании*. Уфа. 2013. С. 34.

[2] Симанов Е. В. // *Актуальные вопросы науки и образования. Сборник тезисов Уфа: Изд-во РИЦ БашГУ. 2013.*

Флюоресцентная визуализация фармакокинетики микрокапсул

Смирнова Оксана Дмитриевна

Букреева Т.В., Ванцян М.А., Марченко И.В.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Букреева Татьяна Владимировна, к.х.н.

SmirnovaOksana@ya.ru

Микрокапсулирование лекарственных препаратов перспективно для целей регенеративной медицины как способ локализованной пролонгированной доставки веществ. Микрокапсула представляет собой оболочку из последовательно нанесённых полиэлектролитных слоёв, взаимодействующих между собой электростатически как поликатион и полианион и являющихся диффузионным барьером для внутреннего содержимого, чем и достигается пролонгация дозирования. Наиболее удобными и доступными полимерами для формирования микрокапсул являются декстран сульфат и хитозан, последовательно наносимые на пористые ядра из CaCO_3 , которые предварительно пропитываются лекарственным веществом.

Целью настоящей нашей работы явилось *in vivo* изучение фармакокинетики таких микрокапсул, содержащих Фотосенс (смесь фталоцианиновых красителей, часто применяемую для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии, производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК»), иммобилизованный в 3-слойные и 5-слойные полиэлектролитные микрокапсулы из последовательно нанесённых слоёв декстран сульфата и хитозана в организме мышей при внутримышечных введениях. Для этого опытным группам мышей HSK (самцам возраста 6-9 месяцев, массой 32-38 г) вводили суспензии микрокапсул в физрастворе ($0,3 \cdot 10^{12}$ шт/мл) в бедренную мышцу задней лапы, а затем регулярно проводили лазерную флуоресцентную спектроскопию поверхностей тела животных *in vivo*, а также внутренних органов отдельных животных в различные контрольные сроки *ex vivo*. Вводимые суспензии микрокапсул содержали в среднем 0,1 мг капсул (концентрация 0,15 мкг/мл), содержание полимерной фракции при этом - 0,02 мг/животное. Флуоресцентную диагностику осуществляли при помощи лазерного диагностического комплекса «ЛАКК-М», с мощностью

возбуждающего излучения менее 3 мВт на длине волны 632 нм, обладающего гибким выносным зондом, который прикладывали перпендикулярно без нажима к исследуемым органам и тканям. Максимум флюоресценции Фотосенса наблюдали при 680-683 нм. По интенсивности флюоресценции в данной части спектра предварительно были построены калибровочные графики зависимости интенсивности детектируемого сигнала от содержания Фотосенса для различных тканей. Возможности методики оказались ограниченными минимальной и максимальной детектируемой концентрацией препарата от $0,5 \cdot 10^{-3}$ г/л до $10 \cdot 10^{-3}$ г/л для печени и мышечных тканей.

На основании полученных данных сигнала флюоресценции Фотосенса построена динамические (эволюционные) графики содержания препарата в различных органах и тканях (рис.1).

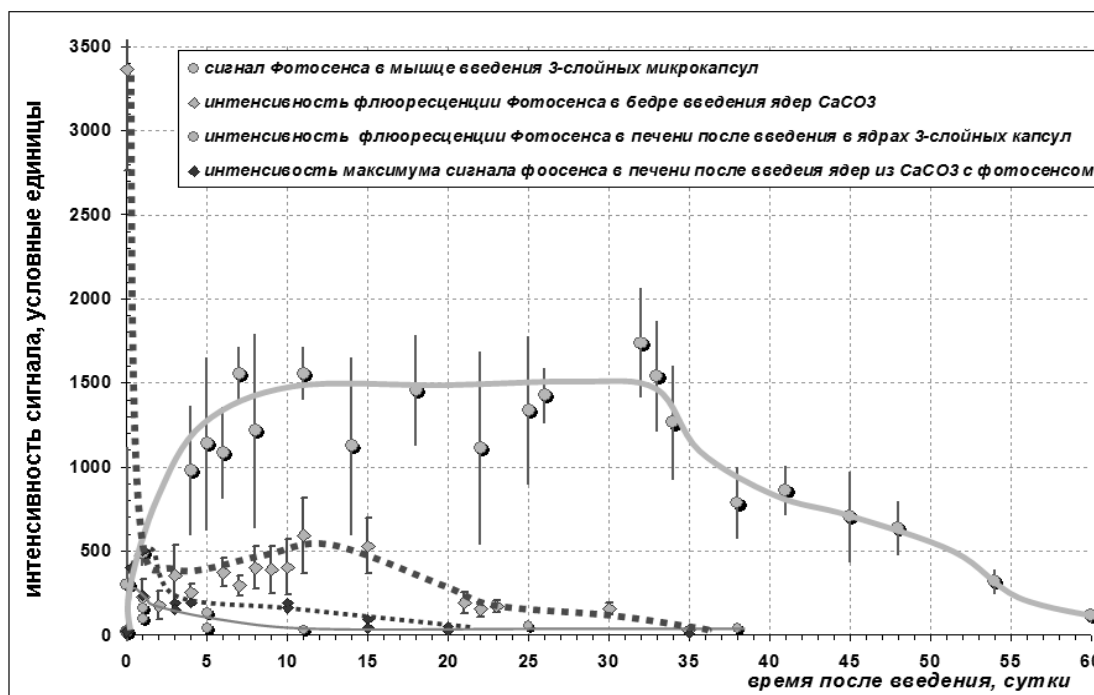


рис.1. Динамика сигнала Фотосенса в области введения и печени исследуемых групп животных

Для выяснения роли полиэлектролитных слоёв и твёрдого ядра в качестве носителя были проведены сравнительные исследования для аналогичных введений ядер с Фотосенсом без полимерных оболочек, капсул с растворёнными ядрами, капсул с 3 и 5 последовательными слоями хитозана и декстран сульфата, а также отдельного введения неокрашенных ядер и капсул внутримышечно и эквивалентного количества Фотосенса – внутривенно. Основной практической сложностью оказался процесс введения суспензий – так как капсулы со временем агрегировали и забивали просвет иглы. Агрегация отразилась и на фармакодинамике препарата, поскольку после введения в мышцу суспензия образовывала комки, препятствуя выходу препарата из центральных капсул комка. Такие комки резорбировались в мышцах мышей на протяжении 6–9 недель, на всём периоде которого производилась диагностика. Выявлено, что такое введение препарата вызывает умеренную воспалительную реакцию на протяжении первых 10 суток после введения, давая ложноположительный сигнал и немонотонно изменяя оптические параметры тканей с временным увеличением оптической плотности тканей на 3-7 сутки после введения, в полном соответствии с фазами воспалительных реакций. Эти обстоятельства следует учитывать при восстановлении фармакокинетической картины по флюоресцентному сигналу метки.

В целом, острых токсических эффектов и отклонений в поведении животных выявлено не было. Не было обнаружено и статистически значимого увеличения времени системного дозирования Фотосенса при переходе от 3-слойных капсул к 5-слойным. Пролонгация в данном случае была только местной, в области введения, однако отличалась большей устойчивостью в концентрации препарата. Полученная картина связана как с агрегацией вводимых капсул, так и с низким коэффициентом связывания Фотосенса с ядрами CaCO₃ и хорошей диффузионной подвижностью в растворах используемых полиэлектролитов. В этой связи представляется целесообразным модифицировать поверхность капсул, а также использовать для визуализации флюоресцентные метки, ковалентно связанные с исследуемыми полиэлектролитами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, Проект № 13-03-00913.

Спектроскопия эндогенной флюоресценции как метод контроля за состоянием тканей барабанной перепонки после хирургического лечения экссудативного среднего отита

Смирнова Оксана Дмитриевна

Золотова Анна Владимировна

Московский областной научно-исследовательский клинический институт

им. М.Ф. Владимирского

Свиштушкин Валерий Михайлович

SmirnovaOksana@ya.ru

Экссудативный средний отит (ЭСО) характеризуется скоплением жидкости за барабанной перепонкой при отсутствии признаков острой инфекции [1]. Части пациентам с ЭСО проводится хирургическое лечение, которое предполагает формирование перфорации барабанной перепонки и направлено на удаление экссудата из барабанной полости. Среди хирургических способов лечения наиболее распространен метод шунтирования, являющийся достаточно эффективным [1,2,3]. Не менее эффективным и более безопасным методом для лечения пациентов с ЭСО является лазерная мириинготомия, а в последние годы появились данные о выполнении радиоволновой мириинготомии, которая, по мнению авторов, может стать альтернативой классическому методу шунтирования [4,5,6]. Однако, в доступной нам литературе не удалось обнаружить работ, оценивающих восстановление тканей барабанной перепонки после данных видов хирургического лечения ЭСО. Ранее нами проведено исследование по спектральному сравнению эндогенной флюоресценции тканей барабанной перепонки у пациентов с ЭСО, одной группе которых выполнялось шунтирование барабанной полости, второй – лазерная мириинготомия. В результате было выявлено, что после лазерной мириинготомии происходит более близкое к норме восстановление структуры собственной пластинки барабанной перепонки по состоянию флюоресценции коллагена и эластина [7].

Целью настоящего исследования явилось сравнение восстановления слоев барабанной перепонки после лазерной и радиоволновой мириинготомии в условиях эксперимента.

Исследование проводилось на крысах линии Вистар, весом 500-600 грамм. Под общим наркозом 0,75 мг уретана/г массы животного, вводили за 20 минут до операции внутривенно. 11 животным выполнена мириинготомия с помощью YAG-Но-лазера с длиной волны 2,09 мкм, 15 животным – мириинготомия с помощью радиоволнового аппарата Cugis (частота 4 МГц). До создания перфорации, а также на сроках 2 и 4 недели после её закрытия проводилась флюоресцентная спектроскопия тканей барабанной перепонки при помощи лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М. Выносной оптоволоконный зонд устанавливался перпендикулярно на задне-нижний квадрант барабанной перепонки крысы. Возбуждение флюоресценции происходило на длине волны 365 нм. Для удобства сопоставления все полученные распределения интенсивностей обратно рассеянного возбуждающего излучения I_{laser} и флюоресцентного сигнала тканей I_{flu} были линейно преобразованы в коэффициенты флюоресцентной контрастности $k_f(\lambda)$ по формуле 1 для каждого значения длины волны λ .

$$k_f(\lambda) = \frac{1}{1 + \frac{I_{laser}(\lambda)}{I_{flu}(\lambda)}} \quad (1)$$

Мы используем вдвое уменьшенное значение коэффициента флюоресцентной контрастности, чем введённое в литературе ранее [8], поскольку именно такое представление удобно тем, что даёт значения в диапазоне от 0 до 1, что наглядно для сопоставления. А затем для характеристики активности отдельного тканевого флюорофора на участке спектра $[\lambda_1; \lambda_2]$ рассчитывали среднеинтегральное значение k_f по формуле 2:

$$k_f = \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} k_f(\lambda) \cdot d\lambda \quad (2)$$

В результате на участке флюоресценции коллагена и эластина – от 390 до 440 нм показатель k_f восстановленных слоев барабанной перепонки после лазерной и радиоволновой мириинготомии не отличался от показателя k_f неизменной барабанной перепонки, составляя $0,17 \pm 0,03$, $0,18 \pm 0,04$ и $0,23 \pm 0,06$, соответственно.

Однако, нами были обнаружены существенные различия в области флюоресценции порфиринов. Порфирины являются макроциклическими тетрапиррольными соединениями, широко участвующие в путях метаболизма [9]. Из огромного разнообразия у крыс наибольшей флюоресцентной активностью отличается протопорфирин IX, вырабатываемый в норме гардеровой железой, обладающий максимумом флюоресценции на длине волны 630 нм. Замечено, что повышение его уровня сопряжено с длительными гипоксическими и стрессовыми состояниями тканей. Для порфиринов этот показатель, вычисленный на участке 629-632 нм, через 2 недели после закрытия перфорации составил $0,17 \pm 0,08$, $0,13 \pm 0,03$ и $0,14 \pm 0,03$, для лазерной, радиоволновой

миринготомии и в норме соответственно. Через 4 недели получены следующие показатели: $0,17 \pm 0,08$, $0,11 \pm 0,02$ и $0,14 \pm 0,03$, соответственно.

Результаты настоящего исследования показали повышение уровня флюоресценции порфиринов над нормальным после лазерного воздействия, в то время как показатели после радиоволновой миринготомии оставались в пределах нормы. Эти данные свидетельствуют в пользу меньшего неспецифического повреждения тканей барабанной перепонки при радиоволновом воздействии и более комфортных темпах их регенерации. Таким образом, флюоресцентная спектроскопия является быстрой и простой методикой для контроля за состоянием тканей в процессе регенерации, а радиоволновая миринготомия – достаточно перспективным и менее травматичным для слоев барабанной перепонки методом хирургического лечения пациентов с ЭСО. В настоящее время проводится клиническое исследование применения данного метода у пациентов с ЭСО.

Список публикаций:

- [1] Berkman N.D., Wallace I.F., Steiner M.J., Harrison M., Greenblatt A.M., Lohr K.N., Kimple A., Yuen A., Comparative Effectiveness Reviews, No. 101. - 2013.
- [2] Дмитриев Н.С., Милешина Н.А., Вестник оториноларингологии, 2003. - №6. - С. 49-51.
- [3] Rosenfeld R.M, L. Culpepper, K.J. Doyle, K.M. Grundfast, A. Hoberman, M. Kenna, A.S.Liebertal, M. Mahoney, R.A. Wahl, C.R. Woods and B.Yawn, Otolaryngology–Head and Neck Surgery. - 2004. - Vol. 130. - №5.
- [4] Нукифорова Г. Н., Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук. – 2007.
- [5] Cinar F., Ugur M.B., Uzun L., Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2008 Oct;72(10).
- [6] Eken M., Evren C., Sanli A., Aydin S., Paksoy M., Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2007;17(4):224-7.
- [7] Смирнова О.Д., Свистушкин В.М., Золотова А.В., Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук №12 (59) 2013г. Ч.III., стр. 68-72.
- [8] Thunell S, Harper P, Brock A et al., Scand J Clin Lab Invest 60, 541–560.
- [9] Смирнова О.Д., Медицинский академический журнал, приложение, материалы II Всероссийской научной конференции молодых учёных "Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия" 12-14 ноября 2012г., стр. 172-174.

Моделирование потока крови в сосудах с учётом турбулентности

Тофтун Иван Дмитриевич

Волгоградский государственный технический университет

Грецова Наталья Владимировна, к.ф.-м.н.

toftul.ivan@gmail.com

В настоящее время основной целью моделирования гемодинамики является прогноз поведения давления крови в сосудах, а также изучение совместного воздействия различных факторов на ее характеристики. В зависимости от требуемой детализации и сложности исследуемого процесса используются модели разных размерностей. Одномерные модели, описанные, например в [1], позволяют делать гемодинамические расчеты во всей сосудистой сети. Но на образование тромбов существенное влияние может оказывать турбулентность, где определяющим фактором является неоднородность поля скоростей [2].

Задачей данной работы является моделирование несжимаемой жидкости (крови) в просвете вены с учётом турбулентности методом решеточного уравнения Больцмана (Lattice Boltzmann Method) для определения возможности возникновения эритроцитарных тромбов в венах в окрестности холестериновых бляшек. Актуальность этого исследования заключается в выявлении опасных форм бляшек, которые имеют склонность к увеличению собственных размеров и, как следствие, к закупориванию вены.

В LBM методе рассматриваются пространственные узлы (из них и состоит решетка/сетка/lattice), в которых имеются потоки жидкости по дифференцированным направлениям. Поведение жидкости в узлах описывается с помощью выводов гидродинамики, статистической физики, термодинамики и молекулярной физики: численно решается уравнение неразрывности Больцмана, которое на макроскопическом уровне будет соответствовать уравнению Навье-Стокса. На *рис. 1* представлен один из узлов решетки, из которого исходят 8 потоков по различным направлениям:

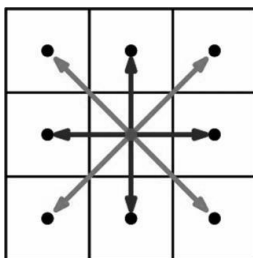


рис.1. Решетка D2Q9 для моделирования двумерных систем

Вычислительный процесс сводится к выполнению двух основополагающих действий: распространение потоков по всем разрешенным направлениям во всех узлах и столкновение потоков. Столкновение заключается в пересчете потоков молекул в каждом узле согласно макроскопической скорости и плотности клетки и соответствующего этим значениям распределению Максвелла, которое задаст статистически верные потоки в каждом из узлов.

В качестве граничного условия применяется условие отражения: узлы на границе отражаются зеркально относительно стенки на шаге переноса. Это условие обеспечивает выполнение законов импульса и энергии. Кроме того, удаётся промоделировать течение Пуазейля.

Связь модели с реальными процессами возможна с учетом безразмерного критерия Рейнольдса: рассчитывается примерный критерий Рейнольдса в моделируемой системе, далее производится нормировка модели. Результат моделирования калиброван в соответствии с реальным процессом.

В процессе моделирования было принято, что скорость эритроцита в какой-либо точке просвета сосуда равна скорости потока в ближайшем узле решетки. Результат численного моделирования потока с несколькими частицами приведен на *рис.2*:

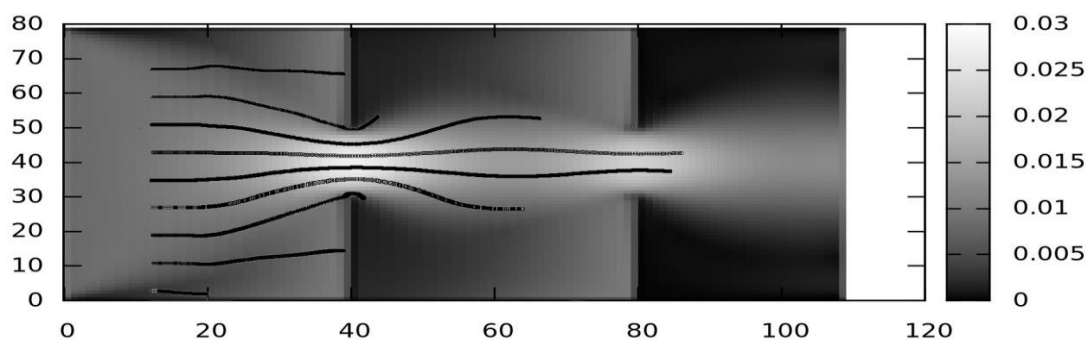


рис.2. Поток эритроцитов в вене с двумя близко расположенными бляшками. Градации серого показывают модуль скорости в узлах моделируемой решетки

Из рисунка хорошо видно, что чем дальше находится частица от центра канала, тем больше вероятность остановиться или задержаться на продолжительное время после/перед препятствием (тромбом). Такое поведение эритроцитов в потоке позволяет прогнозировать расширение тромба. Изменение первоначальной бляшки на бляшку более сложной формы показывает аналогичный результат.

На данном этапе моделирования можно выявить основную закономерность прилипания эритроцита к стенке сосуда в зависимости от формы сужения: чем более резкое сужение сосуда, тем больше вероятность того, что эритроцит залипнет к стенке и образуется дополнительный сгусток, изменяющий просвет сосуда.

На следующем этапе моделирования планируется учет прилипания эритроцита с помощью оценки баланса энергии притяжения-отталкивания. Если энергия притяжения окажется больше, тогда эритроцит «прилипнет», образуется сгусток и просвет сосуда уменьшится.

Список публикаций:

- [1] Кошелев В.Б., Мухин С.И., Соснин Н.В., Фаворский А.П. // Математические модели квазиодномерной гемодинамики. М.: МАКС Пресс, 2010. 114 с.
- [2] Плюснина, Т. Ю. // Влияние электрического поля на пространственно-временные структуры в системе реакция-диффузия // Ю. Т. Плюснина, А. И. Лобанов и др. // Биофизика. 2000. Т. 45 №3. С.495-501.
- [3] Wagner A. J. // A Practical Introduction to the lattice Boltzmann Method. North Dakota State University. 2008. 46 с.
- [4] К. Каро, Т. Педли, Р. Шротер, У. Сид // Механика кровообращения // Под ред. С. А. Резирера, В.М. Хаютина. М.: Мир, 1981. 624 с.
- [5] Баранов В. Моделирование гидродинамики: Lattice Boltzmann Method, 2013. URL: <http://habrahabr.ru/post/190552/> (дата обращения: 01.10.2013).

Исследование медицинских препаратов в биологических тканях оптическими методами

Хаишбашев Геворг Арменакович
Южный федеральный университет
Гуда Александр Александрович, к.ф.-м.н.
gevorik18@gmail.com

В настоящей работе было проведено исследование распределения 3d металлов в органах мыши после инъекции препарата с металлическими наночастицами. Исследование проводилось на атомно-абсорбционном спектрометре. Проводится развитие метода в направлении использования ИК-фурье спектроскопии для качественного исследования взаимодействия молекул медицинских препаратов с биологическими тканями на примере анализа ИК-спектров пропускания противораковых препаратов на основе платины в различных растворах и соединениях.

В первой части данной работы проводились исследования в сотрудничестве с НИИ Онкологии г. Ростова-на-Дону. Ими были предоставлены ткани лабораторных мышей до и после введения препарата в кровеносную систему. Атомно-абсорбционный спектрометр – прибор, предназначенный для проведения количественного элементного анализа по атомным спектрам поглощения. Принцип действия атомно-абсорбционного спектрометра основан на измерении величины поглощения луча света, проходящего через атомный пар исследуемой пробы. Целью этой части работы было определение концентрации Zn в органах (почка, печень, селезенка) крыс: здоровой, с опухолью и крысы с противораковым препаратом. Для решения поставленной выше цели, мы подготовили образцы методом растворения в концентрированной азотной кислоте и провели измерения. Анализ полученных растворов показывает, что концентрация цинка в органах зараженной мыши меньше, чем в здоровой. После введения препарата цинк в почке и селезенке продолжает уменьшаться, а в печени увеличивается.

Во второй части данной работы проводились исследования противораковых препаратов на основе платины. Измерения проводились на ИК Фурье-спектрометре ФСМ 1202. Фурье-спектроскопия – метод оптической спектроскопии, позволяющий получать спектр в результате обратного Фурье-преобразования интерферограммы исследуемого излучения, зависящей от оптической разности хода двух лучей и представляющей собой Фурье-образ спектра (функцию распределения энергии излучения по частоте). Целью этой части работы было исследование взаимодействия молекулы цисплатина, оксалиплатина с белком альбумином крови. Была отработана методика измерения жидких образцов, определены предельные концентрации, доступные для измерений и получены экспериментальные данные для серии модельных растворов.

Определение биологической концентрации лактобацилл в суспензиях с помощью спектрофотометрического метода

Шестакова Надежда Владимировна
Окатова Анна Владимировна, Позолотин Александр Павлович
Вятский государственный университет
Маракулин Игорь Вадимович, д.м.н.
shnadic@yandex.ru

Определение концентрации живых микроорганизмов в суспензиях является важной научной задачей в микробиологических исследованиях. Существуют классические методы определения биологической концентрации, однако они трудоемки и требуют для своего проведения много времени. Поэтому актуальной задачей является разработка нового экспрессного метода определения концентрации живых микроорганизмов в суспензии.

Целью данной работы является разработка методики определения биологической концентрации лактобактерий в суспензиях с помощью спектрофотометрического метода. Данный метод включает следующие этапы: приготовление суспензии лактобацилл, измерение оптической плотности взвеси микробов в средах с высоким и низким осмотическим давлением; определение абсолютного прироста оптической плотности взвеси лактобактерий; определение по результатам плазмолитической реакции клеток концентрации живых микробов в суспензиях.

Для выполнения исследований необходимы: спектрофотометр КФК-2, суспензия лактобактерий, раствор хлористого натрия (7,3%), раствор сахарозы (8,4%). 7,3%-ный раствор хлористого натрия является

гипертоническим по отношению к цитоплазме живых лактобацилл и вызывает их плазмолиз, т.е. уменьшение объема протопласта бактерий вследствие выхода внутриклеточной воды. При этом светорассеяние взвеси микробов возрастает. Мертвые клетки в гипертоническом растворе хлористого натрия не лизируются и светорассеяние взвеси не меняют. «Изотонический» 8,4%-ный раствор сахарозы обеспечивает осмотическое равновесие между протопластом клеток и раствором, в котором находятся бактерии. Микробная оболочка не испытывает осмотической нагрузки, тем самым обеспечивается постоянство объема живой и мертвой клетки, это позволяет избежать существенных различий в светорассеянии взвесей живых и мертвых бактерий. По разности двух значений экстинкции лактобактерий, одно из которых соответствует оптической плотности взвеси микробов в гипертоническом растворе (E_r), а другое оптической плотности взвеси микробов в «изотоническом» растворе ($E_{и}$) определяют абсолютный прирост оптической плотности (E) (1).

$$E = E_{и} - E_r \quad (1)$$

Для построения графика функции зависимости абсолютного показателя оптической плотности от биологической концентрации лактобактерий был проведен ряд опытов, в которых использовали три вида лактобактерий: *L.acidophilus*, *L.buchneri* и *L.plantarum*. На первом этапе исследования были приготовлены суспензии лактобацилл, с оптической концентрацией 1,5, 1, 0,75. Экстинкцию полученных взвесей микробов измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2, в кювете с длиной оптического пути 10,0 мм при светофильтре с длиной волны 0,540 мкм. В качестве контрольного образца использовали дистиллированную воду. 1 см³ суспензии лактобактерий добавляли в одну кювету с 3 см³ гипертонического раствора хлористого натрия (7,3%) и в одну кювету с 3 см³ "изотонического" раствора сахарозы (8,4%). Оптическую плотность данных растворов измеряли в 3 повторностях для каждого вида лактобацилл при трех приготовленных разведениях с оптической плотностью 1,5, 1 и 0,5.

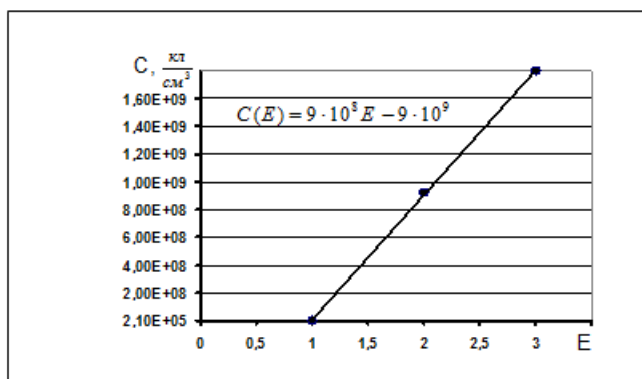


рис.1. Зависимость биологической концентрации лактобактерий в суспензии от абсолютного прироста оптической плотности

Параллельно был произведен высеv лактобактерий из каждого разведения на чашки с питательной средой МРС для определения биологической концентрации. После учета результатов был выявлен пропорциональный характер зависимости разности оптической плотности от биологической концентрации лактобактерий в суспензиях. Результаты опыта представлены на рис. 1.

Уравнение зависимости: $C(E) = 9 \cdot 10^8 \cdot E - 9 \cdot 10^9$. По данному уравнению можно определить биологическую концентрацию лактобактерий в суспензиях.

Данный метод измерения биологической концентрации лактобактерий имеет достаточную для практического применения точность и воспроизводимость. Ошибка данного метода не превышает 11%.

Таким образом, данный метод определения концентрации живых лактобактерий в суспензиях является быстрым, достоверным и простым. Для проведения анализа не требуется сложного оборудования и специальной подготовки, а его выполнение возможно лаборантами, владеющими традиционными приемами микробиологического анализа.

Влияние пероксидазы на процесс электрополимеризации толуидинового синего

Юнусов Артем Рустамович

Удмуртский государственный университет

Черенков Иван Анатольевич, к.б.н.

btmj@ya.ru

В последние десятилетия возрос интерес к электроактивным полимерам, как новому классу органических соединений, и электрополимеризации, как эффективному способу модификации поверхности электродов. Электроактивные полимеры находят применение в создании биоэлектронных устройств, где перед исследователями стоит задача гармонизации биологических объектов с физическими преобразователями сигналов, надёжной иммобилизации биологических компонентов на рабочей поверхности биосенсоров, эффективного переноса заряда. Перспективным направлением является создание «безреагентных» сенсоров, с применением электроактивных полимеров на основе производных фенотиазина [1]. Фенотиозиновые полимеры позволяют модифицировать электродную поверхность, формируя устойчивый электроактивный слой, с высоким сродством к графиту, содержащий функциональные группы для ковалентного присоединения белков. Работами последних лет [2] показано, что ферменты из группы пероксидаз могут быть использованы для синтеза электроактивных полимерных соединений, мономеры которых являются субстратами данных ферментов. Представляет интерес исследование комбинированного процесса – электрополимеризации фенотиозинов в присутствии фермента.

Целью настоящей работы стало исследование влияния пероксидазы из корней хрена на процесс электрополимеризации фенотиозиновых красителей на примере 7-амино-8-метил-фенотиазон-3-илидендиметил-аммония (толуидинового синего).

Электрополимеризацию проводили по методике Barsan M., et al., 2011 [3] с модификациями. В ячейку вносили 150 мкл 0,001 М раствора толуидинового синего, содержащего пероксидазу из корней хрена 0,1 мг/мл в Трис-НСI буфере рН=8,45. Контролем служил раствор красителя, не содержащий фермента. Электрополимеризацию осуществляли в режиме циклической вольтамперометрии в диапазоне потенциалов +1200...-800 мВ, скорость развёртки потенциала 90 мВ/сек, 10-20 циклов. Все потенциалы приведены относительно хлорид серебряного электрода.

Ниже (рис.1,а) приведен график электрополимеризации толуидинового синего (ТС). Он представляет собой зависимость силы тока окисления-восстановления медиатора (полимера) от потенциала электрода. В ходе первого цикла наблюдается характерная кривая окисления-восстановления ТС, пик окисления соответствует -165 мВ, пик восстановления соответствует -400 мВ.

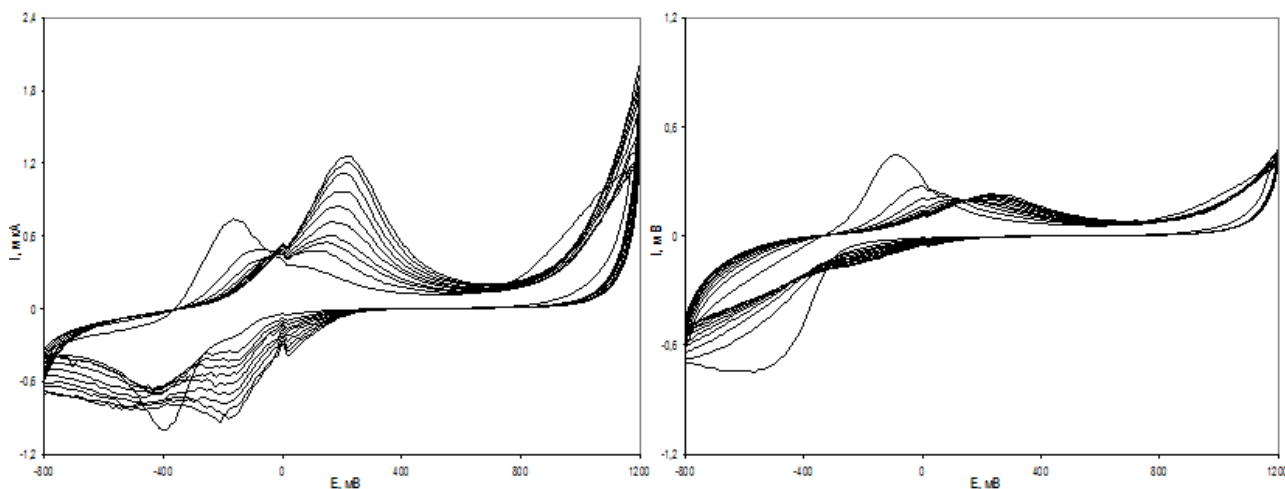


рис.1. Вольтамперная характеристика процесса электрополимеризации толуидинового синего без фермента (а), в присутствии фермента (б)

Для всех феназиновых мономеров процесс электрополимеризации начинается с адсорбции молекул на поверхности электрода. Поскольку графитовая поверхность гидрофобна, мономеры, содержащие 3 гидрофобных ароматических кольца, расположенных в одной плоскости, адсорбируются параллельно этой поверхности [3]. Далее следует анодное окисление медиатора в области $E = +1000... +1200$ мВ, которое является необратимым. В результате образуются радикалы ТС, которые в дальнейшем реагируют с другими мономерами, запуская процесс полимеризации. Полимерная форма ТС характеризуется сдвигом значения потенциала анодного пика ($E_{pa} = 200$ мВ; $\Delta E = 335$ мВ), потенциал катодного пика также смещается ($E_{pk} = -200$

мВ; $\Delta E = 200$ мВ). На втором цикле наблюдается убыль мономерной формы ТС, которая проявляется в снижении пиков окисления-восстановления и смещении окислительного пика в сторону положительных потенциалов, а пика восстановления – в отрицательную. Это объясняется формированием полимерной структуры на поверхности электрода, которая ограничивает доступ свободных молекул медиатора к электроду, выступая в роли конкурента окислительно-восстановительных превращений мономерной формы красителя.

Присутствие пероксидазы значительно влияет на характер вольтамперной кривой ТС. На рис. 1, б представлен график электрополимеризации ТС в присутствии фермента: наблюдается смещение пика окисления ТС в сторону положительных потенциалов ($E_{pa1} = -165$ мВ; $E_{pa2} = -90$ мВ), смещение пика восстановления ТС – в сторону отрицательных. Процесс полимеризации проходит медленнее. Значение силы тока необратимого анодного окисления уменьшилось в 4 раза ($I_{ao1}=1,91$ мкА; $I_{ao2}=0,46$ мкА; $\Delta I_{ao}=1,45$ мкА), возможно, это вызвано конкурентным окислением медиатора пероксидазой. Наблюдаются характерные изменения вольтамперной кривой: рост пика восстановления ТС при резком уменьшении пика окисления, что может быть объяснено высокой скоростью ферментативной реакции, приводящей к накоплению в системе окисленной формы ТС. Интересно, что источником перекиси водорода (второго субстрата пероксидазы) может служить процесс автоокисления ТС кислородом [4].

Важно отметить, что полученный полимер сохранял свои свойства после отмывания красителя с поверхности электрода и нанесения нейтрального буфера. Ниже (рис. 2) представлен график окисления-восстановления полимеров, полученных в разных условиях. Для электродов, на которых полимеризация проводилась в присутствии пероксидазы, отмечено сохранение ферментативной активности. Можно сделать вывод, что воздействие высоких потенциалов в процессе электрополимеризации не вызывает необратимого ингибирования фермента.

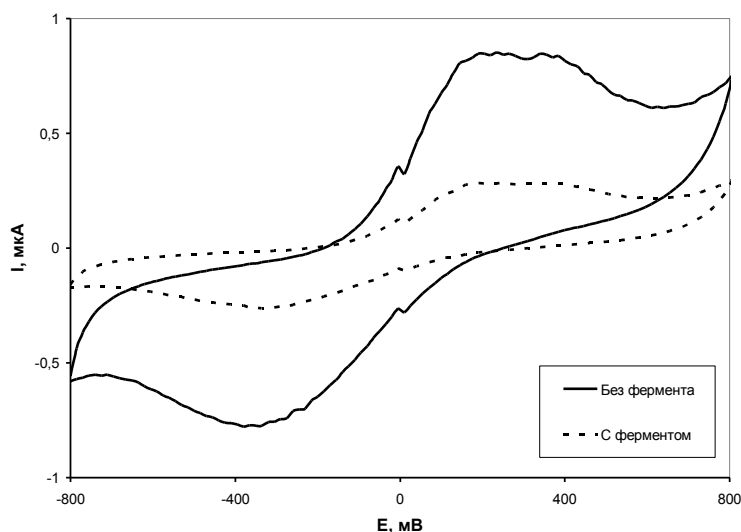


рис.2. Вольтамперная характеристика электродов, модифицированных поли(толуидиновым синим)

Таким образом, присутствие пероксидазы хрена на электроде в процессе электрополимеризации толуидинового синего оказывает существенное влияние на процесс формирования поли(толуидинового синего).

Список публикаций:

- [1] Karyakin A. A., Karyakinal E. E., Schmidt H. // *Electroanalysis* 1999, 11, No. 3, p. 149-155
- [2] Отрохов Г.В. и соавт. // *Успехи биологической химии*, т. 53, 2013, с. 355–386
- [3] Barsan M. M., Pinto E. M., Brett C. M. // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, p. 5462–5471
- [4] Buchholz K., et al. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Jan. 2008, p. 183–191

Электронно-конформационная модель RyR каналов сердечной клетки

Япаров Богдан Ярославович
Сулим Кирилл Игоревич, Зорин Николай Михайлович
Уральский федеральный университет
Москвин Александр Сергеевич, д.ф.-м.н.
ybogdan@yandex.ru

Рианодиновые (RyR) каналы играют ключевую роль в регуляции динамики кальция внутри клеток любого типа мышц. Изучение поведения этого типа каналов позволяет глубже понять принципы мышечного сокращения в любом организме.

Концепция электронно-конформационных взаимодействий лежит в основе понимания физических механизмов функционирования биологических макромолекул [1].

Целью работы является развитие электронно-конформационной (ЭК) модели RyR каналов.

В ЭК модели всё многообразие степеней свободы этих гигантских наномолекулярных белковых образований сведено к (быстрой) дихотомической электронной переменной и (медленной) классической конформационной (Q) координате [2]. Принципиальным отличием ЭК модели от традиционных марковских моделей RyR канала является введение энергетического фактора. В рамках энергетического подхода к описанию состояний канала вводится модельный гамильтониан:

$$\hat{H} = -\Delta \hat{s}_z - h \hat{s}_x - pQ + aQ \hat{s}_z + \frac{K}{2} Q^2 \quad (1)$$

В формуле (1) \hat{s}_z, \hat{s}_x – z и x компоненты матриц Паули соответственно. Первое слагаемое описывает разницу энергий двух электронных состояний канала, второе слагаемое описывает «перемешивание» состояний. Параметры Δ и h являются аналогами некоторого «эффективного поля». Третий член описывает эффекты воздействия на канал со стороны внешних сил, которые условно можно связать с эффективным давлением p . Четвертый член характеризует электронно-конформационные взаимодействия, возникающие в каналах с постоянной взаимодействия a . Последнее слагаемое описывает упругую энергию конформационного состояния канала с константой упругости K .

Собственные значения гамильтониана H дают две ветви конформационного потенциала, минимумы которого связываются с открытым и закрытым состояниями канала, соответственно. Динамика RyR-канала включает быстрые электронные франк-кондоновские переходы между двумя ветвями конформационного потенциала, туннельные переходы между двумя ветвями конформационного потенциала вблизи области пересечения ветвей, медленную конформационную динамику, описываемую уравнением Ланжевена:

$$M\ddot{Q} = -\frac{\partial E(Q)}{\partial Q} - \Gamma\dot{Q} - \eta_{temp} \quad (2)$$

В формуле (2) M – параметр эффективной массы RyR-канала (для упрощения $M=1$), Γ – параметр эффективного трения, η_{temp} – сила случайных температурных флуктуаций в конформационной динамике RyR-канала. Кроме состояний RyR-канала, описываемых эффективным гамильтонианом H , в модель вводится дополнительное, так называемое инактивационное состояние, переход в которое выводит RyR-канал из рабочего режима открытия-закрытия.

Согласно [3],[4], динамика открытия и закрытия RyR-каналов имеет стохастический характер при постоянных внешних условиях. В докладе представлены результаты компьютерного моделирования различных *in vitro* (вне живого организма) режимов функционирования RyR канала, а также сравнение с имеющимися экспериментальными данными. Результаты показывают, что ЭК-модель дает адекватное описание стохастической динамики RyR-канала.

Список публикаций:

- [1] А.Б. Рубин, *Биофизика, книга 1 “Теоретическая биофизика”, Москва, Высшая школа, 1987.*
- [2] A.S. Moskvin et al., *Electron-conformational model of ryanodine receptor lattice dynamics. Progress in Biophysics and Molecular biology, 2006. 90(1): p. 88-103.*
- [3] A. Zahradnikova, J. Bak, and L.G. Meszaros, *Heterogeneity of the cardiac calcium release channel as assessed by its response to ADP-ribose. Biochemical and biophysical research communications, 1995. 210(2): p. 457-463*
- [4] Gyorke, I. and S. Gyorke, *Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel by Luminal Ca²⁺ Involves Luminal Ca²⁺ Sensing Sites. Biophysical journal, 1998. 75(6): p. 2801-2810*

