



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

2-7 июня 2011 года Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (СФУ) и Институт биофизики СО РАН (ИБФ СО РАН) проводят международный научный семинар с **молодежной научной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда»**

Научная тематика:

Новые биоматериалы - синтез, структура, свойства
Современные методы и аппаратуру изучения целевых продуктов биотехнологии
Биоосновные полимеры – характеристики и способы получения
Разрушаемые полимеры и окружающая среды
Области применения биополимеров – промышленность, медицина, фармакология и другое

Цель мероприятий:

- обмен результатами исследований в области получения и исследования продуктов биотехнологии, новых биоматериалов и сфер их применения, роли для развития высоких технологий и охраны окружающей среды;
- развитие научно-образовательного сотрудничества

Мероприятия проводятся в рамках проекта Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ «Биотехнологии новых биоматериалов» под руководством ведущего ученого Энтони Дж. Сински, победившего в конкурсе проектов по постановлению Правительства Российской Федерации № 220 от 9 апреля 2010 года для государственной поддержки научных исследований, проводимых в образовательных учреждениях высшего профессионального образования РФ.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

Научный оргкомитет:

Professor, DSc. **Antoni J. Sinskey**, Department of Biology, Health Sciences & Technology, and Engineering Systems, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA

д.б.н., профессор **Т.Г. Волова**, зав. базовой кафедрой Биотехнологии СФУ

д.б.н., профессор **Е.И. Шишацкая**, зав. кафедрой Медицинской биологии СФУ,

д.х.н., профессор **М. И. Штильман**, Химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Москва. Россия.

Professor, DSc. **Alexander Steinbüchel**, Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany

Professor, DSc. **Dieter Jendrossek**, Institute for Microbiology, University Stuttgart, Germany

Professor, DSc. **V. Hasirci** METU BIOMAT, Ankara, Turkey

D-r, DSc **Aristidis M. TSATSAKIS**, Department of Forensic Sciences & Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Рабочий оргкомитет:

профессор **В.А Сапожников**, директор Института фундаментальной биологии и биотехнологии (ИФБиБ) СФУ

к.ф.-м.н. **И.Е Суковатая**., зам. директора ИФБиБ СФУ, доцент кафедры Биофизики

к.б.н. **С.П. Шулепина**, зам. директора ИФБиБ СФУ, доцент кафедры Наземных и водных экосистем

к.б.н. **С.В Прудникова**., доцент базовой кафедры Биотехнологии

к.б.н. **Е.Н. Сорокина**, доцент базовой кафедры Биотехнологии

к.б.н. **А.Н.Бояндин**, доцент базовой кафедры Биотехнологии

О.С. Максимова, инженер базовой кафедры Биотехнологии



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

НАУЧНАЯ ПРОГРАММА

01 июня 2011 года (среда)

Заезд и размещение иногородних участников

02 июня 2011 года (четверг)

10.00 – 10.30	Регистрация участников , СФУ, пр. Свободный, 79
10.30 – 13.00	Утреннее заседание
10.30 – 10.35	ОТКРЫТИЕ НАУЧНОГО СЕМИНАРА И МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛЫ «БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА» Волова Т.Г. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия</i> <i>Институт биофизики СО РАН, Красноярск. Академгородок</i>
10.35 – 10.45	СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ- ВУЗ XXI ВЕКА Ваганов Е.А. <i>Ректор Сибирского федерального университета,</i> <i>г. Красноярск, пр. Свободный.79</i>
10.40 – 11.00	БИОТЕХНОЛОГИЯ – КЛЮЧЕВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ СФУ Сапожников В.А. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия</i>

11.00 – 11.40	ЧЕЛОВЕЧЕСТВО И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА: ГЛАВНЫЕ ВЫЗОВЫ XXI ВЕКА Печуркин Н.С. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный. 79</i> <i>Институт биофизики СО РАН, Россия, г. Красноярск</i>
---------------	---

11.40-12.00	Кофе-пауза
-------------	-------------------

Ведущие заседания: проф. Волова Т.Г., Кратасюк В.А.	
12.00 – 12.30	ПОЛИМЕРЫ И БИОПОЛИМЕРЫ: РЕАЛИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ Штильман М.И. <i>директор Центра биотехнологии Московского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева</i> <i>Москва. Россия</i>
12.30-13.00	SYSTEM BIOLOGICAL ANALYSIS OF PHA METABOLISM IN RALSTONIA EUTROPHA Steinbüchel A. <i>Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie,</i> <i>Westfälische Wilhelms-Universität Münster</i>

13.00-14.00	Обед
-------------	-------------

14.00 – 18.00	Вечернее заседание
---------------	---------------------------

Ведущие заседания: проф. Сапожников В.А., проф. Бондарь В.С.	
14.00-14.30	TOXICOLOGICAL INVESTIGATIONS OF NEW BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS TSATSAKIS A. <i>Department of Forensic Sciences & Toxicology, Medical School,</i> <i>University of Crete, Heraklion, Greece</i>
14.30-15.00	ДОПУСК БИОМАТЕРИАЛОВ И МЕДИЦИНСКИХ УСТРОЙСТВ К ПРИМЕНЕНИЮ Шигацкая Е.И. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный. 79. Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск.</i> <i>Академгородок 50</i>

14.30-15.00	ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ И ПОТЕНЦИАЛ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БИОТЕСТОВ Кратасюк В.А. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный. 79.</i>
-------------	--

15.00-15.20	Кофе пауза
-------------	-------------------

Ведущие заседания: проф. Shteinbüchel A., проф. Шишацкая Е.И.

15.20-15.50	БИОМАНИПУЛИРОВАНИЕ ТРОФИЧЕСКИМИ ЦЕПЯМИ С ЦЕЛЮ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КАЧЕСТВА ВОДЫ В ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМАХ Гладышев М.И. <i>Институт биофизики СО РАН, Россия, Красноярск, 3600036, Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79</i>
-------------	---

15.50-16.20	СИСТЕМА МЕТРОЛОГИИ, СТАНДАРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ, ДЕЙСТВУЮЩАЯ В РФ Моргун В.Н. <i>Siberian Federal University, Krasnoyarsk, RF</i>
16.50 – 17.20	LESSONS FROM RALSTONIA EUTROPHA DNA CHIP ANALYSIS Sinskey A. J. <i>Department of Biology, Health Sciences & Technology, and Engineering Systems, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA</i>
17.20 – 17.50	БОЛОНСКИЙ ПРОЦЕСС И ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ И БАКАЛАВРОВ В СФУ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОЛОГИЯ» Суковатая И.Е. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный. 79.</i>
17.50-18.00	Информация оргкомитета

18-00	Коктейль
-------	-----------------

03 июня 2011 года (пятница)

10.00 – 13.00 **Утреннее заседание**

Ведущие заседания: проф. Кратасюк В.А., доц.Суковатая И.Е.

10.00 – 10.30 **BIOSYNTHESIS OF BIOPOLYMERS**

Steinbüchel A.

*Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,*

10.30 – 11.00

**HYDROGEN-BASED BIOSYNTHESIS:
BIOTECHNOLOGY OF CHEMOLITHAUTOTROPHIC
HYDROGEN-REDUCING ORGANISMS**

Volova T.G., Sinskey A.

*Institute of Biophysics, Russian Academy of Sciences, Siberian
Division, Krasnoyarsk, Russia, volova45@mail.ru*

*Massachusetts Institute of Technology. The United States of
America, Boston*

11.00 – 11.20

**НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ**

Шишацкая Е.И. Сински Э.Дж.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр.
Свободный. 79*

*Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск. Академгородок
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts,
USA*

11.20-11.40

Кофе-пауза

11.40-12.10

**ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО
ШОВНОГО МАТЕРИАЛА В АБДОМИНАЛЬНОЙ
ХИРУРГИИ**

Винник Ю.С.¹, Маркелова Н.М.¹, Василеня Е.С.¹, Шишацкая Е.И.²

*Красноярский государственный медицинский университет имени
проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Росздрава. ²Сибирский
федеральный университет, пр. Свободный 79, Россия*

12.10-12.40	BEYOND PEPTIDE DELIVERY: IMPROVING THE CONTROLLED RELEASE OF PROTEINS Shwendtvan A. <i>Cerenis Therapeutics, Ann Arbor, MI. Detroit. USA,</i>
12.40-13.00	DETONATION NANODIAMONDS AS A BASE FOR DESIGN OF SENSING AND ADDRESS DELIVERY SYTEMS Purtov K.V.¹, Petunin A.I.², Mamaeva E.S.^{1,3}, Baron A.V.³, Puzyr A.P.¹, Burov A.E.^{3,4}, Bondar V.S.^{1,3} ¹ <i>Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia</i> ² <i>Midical Research Company "Dias", Krasnoyarsk, Russia</i> ³ <i>Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia</i> ⁴ <i>SDTB "Nauka", KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia</i>
13.00-13.10	СОЗДАНИЕ GMP ПИЛОТНОГО ПРОИЗВОДСТВА РАЗРУШАЕМЫХ БИОПЛАСТИКОВ Шишацкий О.Н. <i>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия</i>

13.10-14.00	Обед
14.00 – 18.00	Вечернее заседание

Ведущие заседания: проф. Сапожников В.А., проф. Гладышев М.И.	
14.00 – 14.30	НАНОАЛМАЗЫ ВЗРЫВНОГО СИНТЕЗА В БИОТЕХНОЛОГИИ Бондарь В.С. <i>Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Россия</i>
14.30-14.50	ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ В КАЧЕСТВЕ РЕЗОРБИРУЕМОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ И ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ А.В. Горева¹, Е.И.Шишацкая^{1,2} ² <i>Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Академгородок 50;</i> ² <i>Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Россия</i>
14.50-14.10	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ВЛИЯНИЯ ВЯЗКОСТИ РАСТВОРА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКАХ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ Суковатая И.Е. <i>Красноярск, Россия. Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79</i>

14.10-14.30	СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РЕЗОРБИРУЕМЫХ ПГА РАЗЛИЧНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА Николаева Е.Д.¹, Шишацкая Е.И.^{1,2} ² Институт биофизики СО РАН, Академгородок 50г. Красноярск, Россия. Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79
14.30-14.50	EMERGING HEALTH ISSUES FROM CHRONIC PESTICIDE EXPOSURE: INNOVATIVE METHODOLOGIES AND EFFECTS ON MOLECULAR CELL AND TISSUE LEVEL TSATSAKIS A. Department of Forensic Sciences & Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece
14.50 -16.00	СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ: Раздел 1: Новые биоматериалы: синтез, структура, свойства Раздел 2: Биотехнология и окружающая среда

16.00-16.10	Кофе-пауза

16.10-16.30	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Е-ИНСТРУМЕНТАРИЯ В БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ Суковатый А. Г., Комаров В. А., Суковатая И. Е., Худоногов Д. Ю. Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79
16.30-17.00	УПРАВЛЕНИЕ КОЛЛЕКЦИЯМИ СТАТЕЙ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ MENDELEY; ЛИЧНАЯ БИБЛИОТЕКА УЧЕНОГО XXI ВЕКА Денисов И.А. Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79
17.30 – 18.00	МАСТЕР-КЛАСС: СОЗДАНИЕ СОБСТВЕННОЙ НАУЧНОЙ БИБЛИОТЕКИ В СИСТЕМЕ MENDELEY

04 июня 2011 года (суббота)

10.00 – 13.00 **Утреннее заседание**

Ведущие заседания: проф. Шишацкая Е.И. проф. Миронов П.В.

10.00 – 10.30 **BIOPOLYMERS**

Jendrossek D.

Institute for Microbiology, University Stuttgart, Germany

10.30 – 11.00 **БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
БИОМОЛЕКУЛ**

Миронов П.В.

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр.
Свободный, 79*

*Красноярский государственный технологический
университет, Красноярск. Россия*

11.00 – 11.30 **ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ ДЛЯ
КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И КАЧЕСТВЕННЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

Калачева Г.С.

Институт биофизики СО РАН, Россия, Красноярск, 3600036,

11.30-11.50 **Кофе-пауза**

11.50 – 12.20 **ПРОДУКЦИЯ НЕЗАМЕНИМЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА
БИОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОДНЫХ
ЭКОСИСТЕМАХ**

Сущик Н.Н.

*Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск,
660036, Россия*

*Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79,
Красноярск,*

12.20 – 12.50 **ТЕХНОГЕННЫЕ РАДИОНУКЛИДЫ В БАССЕЙНЕ
РЕКИ ЕНИСЕЙ**

Болсуновский А.Я., Дементьев Д.В.

*Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск,
Россия*

12.50 – 13.20 **ИНТЕГРИРОВАННАЯ ОЦЕНКА И МОДЕЛИРОВАНИЕ
СТРУКТУРЫ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ**

Задереев Е.С.

*Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск,
660036, Россия*

*Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79,
Красноярск,*

13.20-14.20		Обед
14.20 – 18.00		Вечернее заседание
Ведущие заседание: проф. Штильман М.И., проф. Сущик Н.Н.		
14.20 – 15.20	СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ: Раздел 2: Методы исследования биологических систем	
Ведущие заседания: проф. Кратасюк В.А. проф. Волова Т.Г.		
15.20 – 15.50	БИОМАТЕРИАЛЫ И НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ Штильман М.И. директор Центра биотехнологии Московского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева Москва. Россия	
15.50 – 16.10	STRUCTURE/FUNCTION ANALYSIS OF PHB DEPOLYMERASE PhaZ7 FROM PAUCIMONAS LEMOIGNEI Jendrossek D., Hermawan S. Institute for Microbiology, University Stuttgart, Germany	
16.10-16.30		Кофе-пауза
16.30 – 18.00		Вечернее заседание
Ведущие заседания: проф. Кратасюк В.А. доц. Шулепина С.П.		
16.30 – 16.40	МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИ-БУТИРАТА/4-ГИДРОКСИБУТИРАТА, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ Жила Н.О. ^{1,2} ¹ Сибирский федеральный университет, 660041, пр. Свободный, 79, Красноярск, Россия ² Институт биофизики СО РАН, 660036, Академгородок	

16.40 – 16.50	ОЦЕНКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ИЗ ПГА, НАГРУЖЕННЫХ РУБОМИЦИНОМ, НА ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА Кузьмина А.М., Горева А.В. ¹Сибирский федеральный университет, г.Красноярск, пр.Свободный 79
16.50 – 17.00	ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, НАГРУЖЕННЫМИ АНТИБИОТИКОМ, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МАГНИТНОГО ПОЛЯ Лысенко Е.В. Сибирский Федеральный Университет, г.Красноярск, пр. свободный, 79
17.00 – 17.10	ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КОНТРОЛИРУЕМОГО ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ ПОР ЕЗОСТРУКТУРИРОВАННОГО СИЛИКАТА ТИПА МСМ-41 С УЧАСТИЕМ МЕТИЛДИМЕТИЛАМИНА Мяснова Ж.С. , Парфенов В.А. Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр.Свободный, 79,
17.10 – 17.20	СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАЛЬНЫХ И МОДЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ПО ИХ ИНФОРМАЦИОННОЙ ЕМКОСТИ Коваль А.А.¹, Садовский М.Г.² ¹Сибирский федеральный университет, РФ, г.Красноярск, пр. Свободный, 79 ²Институт вычислительного моделирования СО РАН, РФ, Красноярск
17.20 – 17.30	ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ И pH РЕАКЦИОННОЙ СРЕДЫ НА КИНЕТИКУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИФЕРМЕНТНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ Бука Н.С. , Суковатая И.Е. Сибирский федеральный университет, г. Красноярск пр. Свободный, 79, Россия
17.30 – 18.00	Обсуждение докладов

05 июня 2011 года (воскресенье)

Экскурсия в Красноярский заповедник «Столбы»

06 июня 2011 года (понедельник)

10.00 – 13.00 **Утреннее заседание**

Ведущие заседания: проф. Волова Т.Г., доц. Суковатая И.Е.

10.00 – 10.10	ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА Вашкевич П.В. Малышева Е.А. Сибирский Федеральный Университет. Россия 660036 г. Красноярск
10.10 – 10.20	УСЛОВИЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ КОЭВОЛЮЦИОННОГО СИМПАТРИЧЕСКОГО ВИДООБРАЗОВАНИЯ В ТОЧЕЧНОЙ МОДЕЛИ ЭКОСИСТЕМЫ Волкова А. Г., Барцев С. И. <i>Сибирский федеральный университет, 660062, г. Красноярск,</i>
10.20 – 10.30	ХАРАКТЕРИСТИКИ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА В ЖЕЛАТИНЕ Безруких А.Е. ¹ , Есимбекова Е.Н. ² <i>¹Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия; ²Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск,</i>
10.30 – 10.40	ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ НАДН:ФМН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА В РАСТВОРАХ ПОВЫШЕННОЙ ВЯЗКОСТИ Сутормин О.С., Суковатая И.Е. <i>Сибирский федеральный университет</i>
10.40 – 10.50	ОЦЕНКА ОСТАТОЧНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЕССОЛЕННОЙ НЕФТИ С ПОМОЩЬЮ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ FMN:NADH-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА Лукьяненко К.А. <i>Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79</i>

10.50 – 11.00	ОСОБЕННОСТИ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ КУЛЬТУР ЗЕЛЕННЫХ, СИНЕ- ЗЕЛЕННЫХ И ДИАТОМОВЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ Т.Н. Ларина <i>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия</i>
---------------	--

11.00-11.30	Кофе-пауза
-------------	-------------------

10.30 – 11.40	ПОЧВЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ - БИОДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ Прудникова С.В. <i>Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79,</i>
10.40 – 11.50	БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В ПОЧВАХ ВЬЕТНАМА Бояндин А.Н. ¹ , Фам Тхи Тхем ² , Ивонин В.Н. ² , Филичев Н.Л. ³ ¹ <i>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;</i> ² <i>Головное отделение Российско-Вьетнамского Тропического Центра, Ханой, Вьетнам;</i>
10.50 – 12.30	Обсуждение докладов

12.30-13.30	Обед
-------------	-------------

13.30 – 18.00	Вечернее заседание
---------------	---------------------------

13.30 – 14.30	Подведение итогов стендовой сессии Награждение победителей
14.30-15.00	Принятие решения по итогам научного семинара и летней школы

СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И 3-ГИДРОКСИ-ГЕКСАНОАТА БАКТЕРИЯМИ *R.EUTROPHA*

Сырвачева Д.А.

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

СИНТЕЗ БИОРАЗРУШАЕМОГО СОПОЛИМЕРА 3-И 4-ГИДРОКСИ-МАСЛЯННОЙ КИСЛОТЫ (ПОЛИ(3-ГБ-СО-4-ГБ))

Осипова И.В.

Сибирский федеральный университет, Институт биофизики СО РАН, г.Красноярск

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ ПГА БИМЕДИЦИНСКИХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ЗАДАЧ КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Шумилова А. А.¹, Николаева Е.Д.²

*¹Сибирский Федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail:ann29402565@yandex.ru*

²Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Академгородок

ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Николаева Е.Д.^{1,2}, Гончаров Д.Б.¹

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ФОРМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА

Умняшкина О.С., Шендрик М.А.

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

ИНФЕКЦИИ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ – МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Коростелева Н.С.¹, Аверьянов А.Б.², Новикова Т.В.², Пашкова Д.Н.²

Красноярский государственный медицинский университет

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ БИОМАТЕРИАЛОВ

Смирнова Е.Ю.¹, Шевцова А.О.²

¹Сибирский Федеральный Университет, ² Красноярский филиал Гематологического научного Центр МЗСР РФ, Красноярск, Россия

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУННЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХ

Кравец А.Ю.

Сибирский федеральный университет, КНЦ СО РАН, ул.Академгородок

**АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВЫХ МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ
С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА В ПРИСУТСТВИИ
ГИДРОКСИАПАТИТ-КОЛЛАГЕНОВОГО КОМПЛЕКСА**

Пасечникова Ю.Ю.¹, Круглик О.В.²

¹Сибирский федеральный университет, ²Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме КНЦ СО РАН, Красноярск

**АПТАМЕРЫ КАК СРЕДСТВО ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО
ЧЕЛОВЕКА**

Замай Г.С., Замай Т.Н.

Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Россия

**БИОЛЮМИНИСЦЕНТНЫЙ ПОДХОД К КОНТРОЛЮ
ТРЕНИРОВОЧНОГО ПРОЦЕССА**

Кратасюк В. А., Черняев В. А.

Сибирский Федеральный Университет. Россия 660036 г. Красноярск

**ВЛИЯНИЕ ТРИТИЯ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ТЕСТОВЫЕ
СИСТЕМЫ**

Архипова В.В.¹, Кудряшева Н.С.²

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ФАКТОРА
ЛЕЙДЕНА И ЕЁ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ У
СПОРТСМЕНОВ РАЗРЯДНИКОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ В СФУ**

Руденко Н.В.^{1,2}, Петухова А.В.^{1,2}, Суховольская М.А.^{1,2}, Шайхутдинова Р.В.^{1,2}

*Сибирский Федеральный Университет,¹ Красноярский филиал ФГБУ
Гематологический научный Центр Минздравсоцразвития России²*

**ИНФЕКЦИИ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ –
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Коростелева Н.С.¹, Аверьянов А.Б.², Новикова Т.В.², Пашкова Д.Н.²

Красноярский государственный медицинский университет

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ
МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ МЕТОДОМ
ЯМР-ТОМОГРАФИИ**

Хилажева Е.Д.

Сибирский федеральный университет, Красноярский научный центр СО РАН

**ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ КРОВИ
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Сумарокова М.В.

Сибирский федеральный университет,, РФ, г.Красноярск, пр. Свободный, 79

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.А. Калачев

Сибирский федеральный университет, РФ, г.Красноярск, пр. Свободный, 79

АНАЛИЗ ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ СВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ ГЕНОМА И ТАКСОНОМИЕЙ ЕГО НОСИТЕЛЯ

Зайцева Н.А.

Сибирский федеральный университет,, РФ, г.Красноярск, пр. Свободный, 79

РОЛЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ CodY В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *Bacillus Intermedius*

Сибгатуллина Э.Э.

Казанский Приволжский Федеральный Университет, биолого-почвенный

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ ДЕТОКСИКАЦИИ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ ГУМИНОВЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Кислан С. Л.¹, Тарасова А. С.¹, Кудряшева Н. С.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОДЕГРАДАЦИИ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Коробихина К.И, Прудникова С.В.

Сибирский федеральный университет. проспект Свободный 79,

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ГАММА-ФОНА В ЦЕНТРАЛЬНЫХ РАЙОНАХ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

Писарев В.С.¹, Григорьев А.И.², Чечеткин В.А.³

*¹Сибирский федеральный университет, кафедра физико-химической биологии
ИФБиТ, ²ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»,*

³Лаборатория радиационного контроля ООО «ГеоЛа»

РАДИАЦИОННО-ГИГИЕНИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ТЕРРИТОРИИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ ЗАСТРОЙКИ Г. МИНУСИНСКА

Захарова О.А.

Сибирский федеральный университет, кафедра биофизики ИФБиТ

*А.И. Григорьев (зав. отделом радиационно-гигиенического мониторинга ФГУЗ
«Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»)*

ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ГОДИЧНЫХ КОЛЕЦ *LARIX GMELINII* (RUPR) RUPR

Почебыт Н.П.¹, Брюханова М.В.²

¹ Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, пр. Свободный 79

**ЗООБЕНТОС СРЕДНЕГО ТЕЧЕНИЯ РЕКИ ЕНИСЕЙ, КАК ОБЪЕКТ
КОРМОВОЙ БАЗЫ ХАРИУСА СИБИРСКОГО
(*THYMALLUS ARCTICUS*, pALLAS)**

Семёнова Е.М., Шулепина С.П.

Сибирский Федеральный Университет, г.Красноярск, Россия

**ГИДРОФИЗИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ОЗЕРА
ШУНЕТ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ЭКОЛОГИЮ ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ
БАКТЕРИЙ**

Тарновский М.О.

Сибирский федеральный университет..Россия. г. Красноярск, пр. Свободный

**ТРОФОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ЗООПЛАНКТОНА И ФИТОПЛАНКТОНА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО –
МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Бородина И.М.

Сибирский федеральный университет. Россия. г. Красноярск, пр. Свободный

**ПОЛУЧЕНИЕ СТАНДАРТОВ-ЭТАЛОНОВ
КАРОТИНОИДОВ ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ
ФОТОТРОФНОГО СООБЩЕСТВА ОЗЕРА ШИРА**

Гребенщикова А.С.¹, Рогозин Д.Ю.²

*¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО
РАН*

**ИНТЕНСИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ³²P ГИДРОБИОНТАМИ РАЗНЫХ
ТРОФИЧЕСКИХ УРОВНЕЙ РЕКИ ЕНИСЕЙ**

¹Карпов А.Д., ²Болсуносский А.Я.

*¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН,
г.Красноярск, Россия*



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

РАЗДЕЛ 1

НОВЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ - СИНТЕЗ, СТРУКТУРА, СВОЙСТВА

BIOPOLYMERS

Jendrossek D.

*Institute for Microbiology, University Stuttgart, Germany,
imbdj@imb.uni-stuttgart.de*

Living organisms consist mainly of water-suspended, -solubilised or -emulsified biopolymers. The most important polymers on a quantity basis are polysaccharides (part of cell walls, carbon and energy storage compounds) and poly(α -aminocarbonic acids) (proteins, enzymes). Cellulose, starch and ribulose-bisphosphate-carboxylase (key-enzyme of carbon dioxide fixation) are the most prominent representatives of these two polymer groups. Nucleic acids (DNA, RNA) and poly(coniferylalcohol) (lignin) represent the third and fourth biopolymer group, respectively. Polyisoprene (natural rubber, produced by rubber-tree *Hevea brasiliensis* and other plants) is another important biopolymer. The ability of many bacteria to synthesize and to accumulate polyesters in form of inclusions of polyhydroxyalkanoates (PHAs) is less known. PHAs fulfill the function of a carbon and energy reservoir similar to triacylglycerols in higher organisms. Last not least bacteria are able to synthesize a few inorganic polymers or polymer-like substances such as polyphosphate, sulfur globes, magnetite and greigite in magnetotactic bacteria (bacteria that are able to orientate themselves in the earth magnetic field).

Natural polymers are based on renewable resources in contrast to most chemically synthesized polymers that are derived from petro chemistry. Moreover, natural polymers are biodegradable and are considered as more environmentally friendly than non-biodegradable conventional polymers. Some aspects on synthesis, degradation and application potentials of biopolymers will be given.

ПОЛИМЕРЫ И БИОПОЛИМЕРЫ: РЕАЛИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Штильман М.И.

*Химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Москва.Россия
shtilmanm@yandex.ru*

Увеличение объемов производства синтетических пластмасс становится глобальной экологической проблемой. Полимерные материалы необходимы для различных сфер человеческой деятельности, они стали неотъемлемой частью современной жизни; они заменяют сегодня сталь, древесину и стекло. По прогнозам, потребление этих материалов на душу населения увеличится к 2010 году в США, Западной Европе и Японии с 24,5 кг до 37,0 кг. Термин "полимерные материалы" является обобщающим. Он объединяет три обширных группы синтетических пластиков, а именно: полимеры; пластмассы и их морфологическую разновидность - полимерные композиционные материалы (ПКМ) или, как их еще называют, армированные пластики. Полимерами принято называть высокомолекулярные вещества (гомополимеры) с введенными в них добавками, а именно стабилизаторами, ингибиторами, пластификаторами, смазками, антирадами и т. д. Физически полимеры являются гомофазными материалами, они сохраняют все присущие гомополимерам физико-химические особенности. Пластмассами называются композиционные материалы на основе полимеров, содержащие дисперсные или коротковолокнистые наполнители,

пигменты и иные сыпучие компоненты. Наполнители не образуют непрерывной фазы. Они (дисперсная среда) располагаются в полимерной матрице (дисперсионная среда). Физически пластмассы представляют собой гетерофазные материалы с изотропными (одинаковыми во всех направлениях) физическими макросвойствами. Пластмассы могут быть разделены на две основные группы - термопластические и термореактивные. Термопластические пластмассы после формирования могут быть расплавлены и снова сформованы; термореактивные, сформованные раз, уже не плавятся и не могут принять другую форму под воздействием температуры и давления. Почти все пластмассы, используемые в упаковках, относятся к термопластическим, например, полиэтилен и полипропилен (члены семейства полиолефинов), полистирол, поливинилхлорид, полиэтилентерефталат, нейлон (капрон), поликарбонат, поливинилацетат, поливиниловый спирт и другие.

В мире ежегодно производится около 200 млн. тонн полимеров в год. При этом основная их часть складывается на свалках, так как повторной переработке в развитых странах подвергается не более 16-20 %. Около 60% всех пластиков, используемых в настоящее время для упаковки - это полиэтилен, главным образом благодаря его низкой стоимости, но также благодаря его отличным свойствам для многих областей применения. Полиэтилен высокой плотности (ПЭНД - низкого давления) имеет самую простую структуру из всех пластиков, он состоит из повторяющихся звеньев этилена. $-(CH_2CH_2)_n-$ полиэтилен высокой плотности. Полиэтилен низкой плотности (ПЭВД - высокого давления) имеют ту же химическую формулу, но отличается тем, что его структура разветвленная. $-(CH_2CHR)_n-$ полиэтилен низкой плотности, в котором R может быть -H, $-(CH_2)_nCH_3$, или более сложной структурой с вторичным разветвлением.

Необходимость проведения мероприятий для рециклизации пластмассовых отходов, в особенности из тары и упаковки, в ряде стран закреплена законодательно. В 2000 году ЕС приняла стандарт EN 13432, регламентирующий требования к биоразлагаемым полимерам. По решению Европейской Комиссии №2001/524/WE он приведен в соответствие с директивой №94/62/WE. Стандарт внедряет критерии оценки и процедуры, касающейся возможности естественного гниения биоразлагаемых синтетических материалов в компостных ямах, а также их обработку без присутствия кислорода (то есть рециклинг органических веществ, а не сжигание).

Радикальным решением проблемы полимерного мусора, является создание и освоение широкой гаммы полимеров, способных биodeградировать на безвредные для природы компоненты. Именно биоразлагаемость высокомолекулярных соединений становится тем приоритетным направлением, которое позволит исключить значительное число проблем "пластмассового мусора", возникающего при использовании полимерной тары и других изделий из полимеров.

Оценка сложившейся ситуации по разработке и освоению биodeградируемых пластиков позволяет выделить три основных направления в этой области:

- получение пластмасс на основе воспроизводимых природных полимеров,
- придание биоразлагаемости широко используемым в настоящее время высокомолекулярным синтетическим материалам,
- синтез биоразрушаемых полиэфиров гидроксикарбоновых кислот.

В опубликованном докладе Института перспективных миссии о разлагаемых полимерах на биологической основе говорится, что к 2020 году на долю этих материалов будет приходиться порядка 5-10 %. Европейские страны с самым большим потреблением биоразрушаемых полимеров – это Германия, Англия, Франция, Италия и Нидерланды. Бельгия, Норвегия, Австрия, Испания, Швейцарии, и эта тенденция расширяется. Сегодня потенциал биопластиков, главным образом, сферы применения и объемы выпуска, в основном зависят от стоимости. СОРА (Комитет Сельскохозяйственной Организации в Европейском Союзе) и COGEA (Общий Комитет Сельскохозяйственного Сотрудничества в Европейском Союзе) провели оценку потенциала биопластиков и наиболее перспективные секторы их применения Европейской экономики. Следует отметить, что применение для биополимеров наталкивается на необходимость преодоления присущих некоторым из них ряда негативных качеств. Например, для изделий из целлюлозы характерна хрупкость; полимеры на основе крахмала влагочувствительны, полилактиды не термопластичны и изделия из них проницаемы для паров воды и кислорода. Но это не может остановить прогресс в бурно развивающейся индустрии биопластиков.

HYDROGEN-BASED BIOSYNTHESIS: BIOTECHNOLOGY OF CHEMOLITHAUTOTROPHIC HYDROGEN-REDUCING ORGANISMS

Volova T.G., Sinskey A.

*Institute of Biophysics, Russian Academy of Sciences, Siberian Division,
Krasnoyarsk, Russia, volova45@mail.ru*

*Massachusetts Institute of Technology. The United States of America, Boston
asinskey@mit.edu*

Growing rates of consumption of food substances and energy resources, population increase, and human-induced impacts have reached the limit beyond which uncoordinated economic activity can lead to irreversible changes in the biosphere. The only way to achieve harmonic coexistence between the growing population of our planet and the biosphere is to pursue coordinated development of science and technology. Development of novel, closed-loop, technologies for complete treatment of natural resources and production of environmentally friendly energy sources and materials that can be involved in the biospheric cycling are the objectives consistent with the conception of the “Agenda of the Twenty-first Century”. Achievements of modern biology, which have led to the formation of physicochemical biology and a number of new branches of biotechnology, exert qualitative effect on various spheres of human activity. The demand for them is growing as is their ability to solve the key issues of the 21st century. The diversity of forms of living matter and the new knowledge on the physics and chemistry of living systems provide a basis for constructing biological systems varied in complexity and organization for the synthesis of a wide spectrum of macromolecules. Among efficient producers of valuable biotechnological materials are chemolithotrophic hydrogen-oxidizing microorganisms, which use hydrogen as the main growth substrate.

Biotechnology, as well as nanotechnology, is among the currently most popular words (and areas of study) in the world. It has been discovered that properties of individual molecules are quite different from those of their large aggregates and that

microorganisms are actually chemical reactors. If we have a great number of these reactors and successfully control them, we'll be able to synthesize the substances we wish to produce. Hydrogen bacteria proper (bacteria oxidizing hydrogen, or "detonating gas" bacteria). Practical interest in hydrogen bacteria was related to their potential use as a regenerative component in closed biotechnological life support systems. More recently, hydrogen bacteria, which grow much faster than other chemoautotrophic organisms, attracted the attention of researchers as a potential source of feed, or even food, protein. Their metabolism and growth were extensively studied in the USA, the FRG, the USSR, and Japan. The late 1980s and the early 1990s saw an upsurge of interest in hydrogen bacteria as very promising producers of polyhydroxyalkanoates (polyesters of alkanolic acids- PHA) – polymers similar to polypropylene but degradable in the natural environment.

Establishment of the Pilot Production Facility (PPF) was based on abundant data accumulated during experiments on culturing of hydrogen bacteria, which included determination of mineral and biochemical composition of biomass, evaluation of parametric growth dependencies of bacterial cells and their nutritional requirements, and designing of laboratory equipment for continuous bacterial cultures. The PPF had been in operation for several years and its performance characteristics corresponded well with the design ones. The facility produced sufficient amounts of biomass for experiments with agricultural animals, aimed at assessing its biological value. The PPF had been in operation for several years and its performance characteristics corresponded well with the design ones. The facility produced sufficient amounts of biomass for experiments with agricultural animals, aimed at assessing its biological value.

Earth's resources are limited. Based on their division into renewable and nonrenewable, some forecasts predict a new industrial crisis in the middle of the 21st century, due to energy and raw material shortages. The currently used agricultural technologies are extensive and there is no reason to expect a fundamental breakthrough in their development. Although grain production has grown considerably due to advances in genetics, selection, and physiology of plants (the first wave of the «Green Revolution»), the increase in food supply still remains an issue of importance. Microbiological production is based on using biochemical activity of microorganisms that can assimilate a wide range of chemical compounds and synthesize biomass of high biological value.

Thus, it was proven experimentally that biomass of hydrogen bacteria could be successfully used in animal feed as a source of animal protein. An important result of the experiments described above is that biomass of hydrogen bacteria used in tested amounts for tested periods of time did not cause any evident toxic effects. The results obtained in the experiments suggest that biomass of hydrogen bacteria can be used as part of the ration given to agricultural animals and birds, to replace traditional animal-derived feed. The range of this replacement is estimated as 25%-50% of the total animal protein in the feed, depending on what animal it is and on its age. The amount of the biomass added to the feed is determined by the type of animal or bird and the raising aims (reproduction, rapid growth, or fattening).

Researchers of the Institute of Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences are engaged in comprehensive investigations of PHAs, including biotechnological studies aimed at synthesizing polymers differing in their chemical composition, studies of PHA structure and physicochemical properties, engineering development of the technology, testing of the techniques to fabricate special polymeric items, and biomedical studies. We have already developed processes of synthesizing variously structured PHAs, using different substrates, studied physicochemical properties of the polymers and shown controllability of some

of these properties (degree of crystallinity, thermal properties, and biodegradation rate). The first Russian Pilot Production Facility for fabricating PHAs has been put into operation – project ISTC. The obtained results are legally protected and the prepared polymer has been registered and trademarked as BioplastotanTM; These findings made it possible, for the first time in practical biotechnology, to synthesize high yields of polyhydroxyalkanoates from products derived from brown coals via modified gasification procedure.

We investigated highly purified PHA samples produced at the Institute of Biophysics SB RAS and synthesized by bacteria *Ralstonia eutropha* B5786 using the technology that allows to obtain PHAs having various chemical structures and high degree of purity, applicable for medical purposes, including contact with blood. Using PHAs in various phase states (solutions, emulsions, powders) we produced and investigated the structure and properties of two- and three-dimensional matrices in the form of flexible transparent films, membranes, superfine fibers, microparticles, sponges, three-dimensional solid and porous constructions. We demonstrated the possibility of application of conventional methods for sterilization of matrices without changing of the structure, loss of strength and deterioration of surface adhesion properties. With the help of microscopy, detection of protein synthesis and DNA by the cultivated cells, MMT test, it was shown that in the cultures of fibroblasts, hepatocytes, endothelium cells and osteoblasts PHA-matrices haven't cytotoxicity at direct contact with any of the investigated cells and that the cells can be cultivated *in vitro*.

LESSONS FROM RALSTONIA EUTROPHA DNA CHIP ANALYSIS

Sinskey A. J.

*Department of Biology, Health Sciences & Technology, and Engineering Systems,
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA
e.mail: asinskey@mit.edu*

Over thirty years ago, we embarked upon a search for the biological basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates, a class of biologically synthesized and biodegradable polyesters. The search led my laboratory to discover and clone the PHA biosynthetic genes from *Zooglea ramigera* and *Ralstonia eutropha*. These discoveries were an important step, as characterization of the genes and enzymes involved in PHA biosynthesis is crucial for understanding the impact of cellular physiology on the properties of the polymer. This remains true today as more companies attempt to market novel PHA production processes to establish niches in the global biopolymer market. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are now being commercialized for both industrial and biomedical applications, with new markets still developing. New opportunities, including use of low cost substrates as carbon feedstocks, will drive additional large volume commercialization activities, while principles of metabolic engineering will lead to the design and subsequent application of new polymers. Many companies are using recombinant *Escherichia coli* as their PHA-producing organism of choice. However, given the metabolic versatility and genetic tractability of *R. eutropha*, we suggest that this paradigm organism can be used as an industrial PHA-producing strain. Recently, my laboratory, along with our Malaysian collaborators, has been constructing a model strain of *R. eutropha* capable of producing mixed chain length PHA from palm oil and palm oil products.

For *R. eutropha* to be a robust industrial organism, we must understand the finer points of metabolism, gene regulation and expression. To this end, we have undertaken a robust microarray analysis of *R. eutropha* under different growth conditions and produced data that can confidently be applied to producing a better industrial strain. Recent accomplishments in this research area will be summarized in this presentation.

SYSTEM BIOLOGICAL ANALYSIS OF PHA METABOLISM IN RALSTONIA EUTROPHA

Steinbüchel A.

*Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster,
alexander.steinbuechel@uni-muenster.de*

The Gram-negative facultative chemolithoautotrophic bacterium *Ralstonia eutropha* strain H16 is being intensively studied since more than 50 years and serves as a model organism to study all aspects of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) metabolism and of the hydrogen-based chemolithoautotrophic growth mode. Although the enzymes and proteins, which are in this bacterium involved in PHA biosynthesis and degradation or in the PHA granule structure, had been in the past already investigated in much detail, the analysis of the genome sequence of strain H16 [1] and other studies unraveled the presence of a large number of homologues of the already known proteins that could be also relevant for PHA metabolism. This indicated that the metabolism of PHAs in bacteria is much more complex than considered previously when in the 1980ies the first PHA biosynthesis genes were identified and cloned. Therefore, proteome [2] and genome-wide transcriptome [3] analyses were employed to detect genes and proteins that are differentially transcribed and synthesized under conditions permissive for PHA biosynthesis and in various stages of PHA metabolism during the time course of cultivation. In addition, we compared the wild type with a PHA-negative mutant. These studies revealed some interesting findings which of these proteins are important for PHA metabolism and which of them are probably not. In addition, a series of single and multiple deletion mutants of *R. eutropha* were generated to support the other findings by the analyses of their phenotypes. *In silico* analysis of the genomes of other PHA accumulating bacteria indicated that the situation is also complex in these bacteria and that the model organism *R. eutropha* is in this regard not exceptional. This knowledge will be helpful to improve the capability of putative PHA accumulating strains to produce PHAs in biotechnological processes.

[1] Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Putter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., VoB, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., and B. Bowien. 2006. Hydrogen-based biotechnology: genome sequence of the bioplastic-producing „Knallgas“ bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnol.* 24:1257-1262.

[2] Raberg, M., Reinecke, F., Reichelt, R., Malkus, U., König, S., Potter, M., W. F. Fricke, A. Pohlmann, B. Friedrich, B. Bowien, and A. Steinbüchel. 2008. *Ralstonia eutropha* H16 changes flagellation according to nutrient supply and state of poly(3-hydroxybutyrate) accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4477-4490.

[3] Peplinski, K., A. Ehrenreich, C. During, M. Bdmeke, F. Reinecke, C. Hutmacher, and A. Steinbuchel. 2010. Genome-wide transcriptome analyses of the „Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to PHA metabolism. Microbiology (SGM), 156:2136-52

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕДИКО- БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Шишацкая Е.И., Сински Э.Дж.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный.79
Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск. Академгородок 50, стр. 50
shishatskaya@inbox.ru
Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA
e.mail: asinskey@mit.edu*

Создание и изучение новых биосовместимых материалов, необходимых для современных реконструктивных медико-биологических технологий, является актуальной проблемой биотехнологии. Повышение эффективности лечения и качества жизни невозможно без внедрения в практику реконструктивной медицины высоких технологий с применением новых материалов высокой функциональности и специфичности, включая конструирование систем, способных воспроизводить биологические функции живого организма. Активно развиваемый в настоящее время новейший подход - это создание биоискусственных органов и тканей, развитие которого делает необходимым освоение новых функциональных материалов. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биотехнологии материалов в последние годы, пока не удалось создать материалы, полностью совместимые с живым организмом. Основными факторами, сдерживающими широкое применение остро востребованных биоразрушаемых полимерных материалов, являются небогатый ассортимент данных материалов, а также пока не решенная проблема регулируемости процессов их функционирования и деструкции в живом организме. Открытие и изучение полигидроксиалканоатов (ПГА) - полиэфиров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии новых материалов. ПГА – это термопластичные, биоразрушаемые и биосовместимые полимеры, сферы применения которых потенциально широки и могут включать восстановительную хирургию, клеточную и тканевую инженерию, трансплантологию.

Получение фундаментальной основы для разработки и реализации новых материалов и устройств требует комплексных исследований. Для понимания механизма взаимодействия материалов и изделий из них с тканями организма необходимы глубокие исследования закономерностей ответа организма на инородное тело, характера регенераторного процесса, с одной стороны, и изучение «судьбы» (включая кинетику биоразрушения и динамику прочностных свойств) имплантируемого материала, с другой. Имплантированные материалы/изделия и живой организм при контакте подвержены взаимовлиянию, как правило, негативного характера, при этом характер и степень выраженности этого воздействия определяются как комплексом физико-химических свойств собственно материала, массой и геометрией имплантата, так и природой и силой ответных физиолого-

биохимических реакций организма-хозяина. Поэтому для освоения новых материалов основополагающей задачей является необходимость глубокого изучения механизма совместимости материала с кровью, тканями и организмом; при этом необходимо ответить на следующие ключевые вопросы: 1) как собственно материал и изделия из него влияют на организм, 2) каков характер ответа организма на имплантацию материала/изделия, 3) под действием каких факторов *in vivo* материал/изделие и каким образом изменяются. Эти исследования реализуются на стыке биотехнологии, химии высокомолекулярных соединений, биофизики, молекулярной и клеточной биологии, медицины и включают разработку новых материалов и переработку их в специализированные изделия; изучение механизма взаимодействия материалов с тканями; оценку биотехнологических, физико-химических и медико-биологических свойств.

В работе представлены результаты комплексных исследований и экспериментальное обоснование применения биоразрушаемых полигидроксиалканоатов в качестве хирургических элементов, самостоятельных эндопротезов и систем доставки лекарственных средств.

Сконструировано семейство экспериментальных образцов хирургических изделий и имплантатов биомедицинского назначения, разработанных из биоразрушаемых полимеров (зарегистрированная марка «Биопластотан»), и проведены комплексные исследования этих изделий. В культурах клеток и в экспериментах на лабораторных животных показана биологическая безопасность созданных полимерных изделий на уровне ответа клеток, тканей и организма. Показано, что биodeградация ПГА *in vivo* реализуется гуморальным и клеточным путями с участием макрофагов и гигантских клеток инородных тел с высокой активностью клеточной и сывороточной кислой фосфатазы; течение процесса биоразрушения ПГА зависит от химической структуры полимера, формы и места имплантации изделия. Впервые исследована реакция различных тканей и закономерности регенераторного процесса в ответ на имплантацию изделий из ПГА и получены количественные данные, характеризующие реакцию тканей на имплантацию ПГА. Показано, что ответная реакция тканей характеризуется не продолжительным посттравматическим воспалением без образования выраженных фиброзных капсул и неблагоприятных реакций. Исследованы свойства серии объемных имплантатов из ПГА и доказано, что ПГА и композиты ПГА с гидроксилалатитом биоинертны и не вызывают цитотоксических реакций *in vitro* и воспалительных, некротических и иных негативных реакций *in vivo*; обладают остеопластическими свойствами, медленно деградируют и способствуют новообразованию костной ткани, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза. ПГА исследованы в качестве матрикса для депонирования и доставки лекарственных средств; доказана безопасность разработанных форм в виде пленок, таблеток и микрочастиц при различных способах введения, изучено распределение и биodeградация полимерных микрочастиц во внутренних органах животных.

Разработано семейство изделий из высокоочищенных образцов ПГА, отвечающих требованиям, предъявляемым к материалам и изделиям биомедицинского назначения. На основе изученных свойств растворов, расплавов, эмульсий и порошков определены параметры для переработки ПГА в специализированные изделия в виде шовных волокон, пленочных и объемных матриксов, микрочастиц, полимерных эндопротезов. Отработаны способы модификации структуры матриксов из ПГА с применением химических и физических методов, обеспечивающие получение функциональных матриксов

(scaffolds) в виде гибких пленок и мембран, пригодных для клеточных технологий. Биологические и физико-химические свойства полимерных изделий позволяют рекомендовать их для использования в различных областях реконструктивной медицины. Моножильный шовный материал из ПГА обладает необходимыми физико-механическими свойствами и пригоден для хирургии. Показана возможность использования ПГА для изготовления полностью биоразрушаемых эндопротезов, эффективных для реконструкции желчевыводящих путей. Разработанные объемные имплантаты из ПГА и в композиции с гидроксилapatитом пригодны для реконструкции дефектов костной ткани. Полимерные микрочастицы являются перспективной лекарственной формой для длительного функционирования *in vivo* при различных способах введения и позволяют осуществить местную доставку антипролиферативных препаратов.

DETONATION NANODIAMONDS AS A BASE FOR DESIGN OF SENSING AND ADDRESS DELIVERY SYTEMS

**Purtov K.V.¹, Petunin A.I.², Mamaeva E.S.^{1,3}, Baron A.V.³,
Puzyr A.P.¹, Burov A.E.^{3,4}, Bondar V.S.^{1,3}**

¹*Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia*

²*Midical Research Company "Dias", Krasnoyarsk, Russia*

³*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia*

⁴*SDTB "Nauka", KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia*

e-mail: bondvs@mail.ru

Development of nanotechnologies opens new opportunities for more effective solution of a wide spectrum of problems arising in various spheres of human activity. Implementation of nanomaterials and nanotechnologies will bring biology, biotechnology, medicine, pharmacology and ecology to a new qualitative level. In this direction, studies on nanoparticles of different physico-chemical nature are being carried out and the list of specific subjects is very extensive.

Nanodiamonds (ND) obtained by detonation synthesis [1] could be an interesting material for specialists in the field. Currently, production of ND at industrial scale is being carried out in Russia and other countries (e.g. China, Ukraine, Bulgaria), however, the priority in invention of the method belongs to Russian scientists [2].

Until recently, ND have been only used in engineering applications. Meanwhile, physico-chemical properties of the nanoparticles, first of all, a pronounced chemical polymorphism of the surface [3,4] allow considering ND as a promising material for biotechnology applications: a new class of adsorbents for separation and purification of biopolymers, and a base for design of sensing and address delivery systems.

We have developed a technology to obtain the modified detonation nanodiamonds (MND), which display a high colloidal stability in dispersing mediums [5-7]. It has been previously shown that MND are perspective for biomedical applications. MND particles are able to bind various biomolecules [8-11] and can be used as a polyfunctional adsorbent for effective extraction and purification of the proteins from protein mixtures [12-15]. Sterile sols for all kind of injections including intravenous ones can be obtained [16]. It has been demonstrated *in vivo* that MND exhibit a high biocompatibility with living bodies [17,18].

In this paper, we discuss the perspectives of using MND as a carrier in systems for the address delivery of substances (e.g. drugs) and indicating systems based on nanoparticle-marker protein(s) complexes.

Negative side effects are intrinsic to many modern medicaments, as upon entering the bloodstream the drug not only exerts the desired therapeutic effect on a pathologic site but has an adverse influence on healthy organs and tissues. That is why the development of medicaments, which exhibit the selective ("target") effect without undesirable secondary reactions, is of current interest. Not less important is a problem to develop new simple and effective means for detection of different compounds (including multiuse systems), which can enhance existing methods. It has been previously shown [19,20] that enzymes adsorbed on the nanodiamonds surface retain catalytic activity. This opens the possibility to create a new class of sensors based on nanodiamonds.

The possibility of obtaining the supramolecular nanodiamond-IgG¹²⁵ and RAM(rabbit anti-mouse antibody)-nanodiamond-BSA¹²⁵ complexes by the covalent attachment of proteins to MND particles has been first demonstrated [21]. The experiments *in vitro* have revealed that the complexes exhibit a high colloidal stability in serum and blood plasma, are inert with respect to the blood cells and do not accumulate. It has been shown that the RAM-nanodiamond-BSA¹²⁵ complexes are able to specifically bind to the target antigen (mouse IgG) immobilized on a model vehicle (Sephacrose 6B). The obtained results allow one to consider the possibility of applying MND as carriers for address deliveries of substances (i.e. drugs) to biological targets *in vivo*.

Capacity of MND for design the indicating systems has been shown as exemplified by a sensory system to measure of glucose. The sensory system has been obtained by simultaneous covalent immobilization of glucose oxidase and peroxidase on the MND surface. To evaluate activity of the MND-enzymes complexes the reaction of oxidative diazotization (hydrogen peroxide - 4-AAP - phenol) has been used. The reaction is catalyzed by peroxidase in the presence of peroxide, which is produced when glucose is oxidized with glucose oxidase. This is accompanied by formation of a colored resultant (quinonimine), which can be measured with a spectrophotometer.

The study has revealed that the enzymes covalently immobilized on MND particles preserve functionality and catalyze a chain of successive biochemical reactions that lead to the colored product. The MND-enzymes complex can function in a wide range of temperature and pH, deionized water and different buffer systems. It provides a linear yield at concentrations (0.01 – 1.5 mg/ml) overlapping the physiological range of glucose values in human blood and can be multiply used (10 and more times) to determine glucose *in vitro*. The designed system retains its functional activity for a month at a storage temperature of +4°C.

The study has been supported by the Presidium of RAS (Program 21, project 64(3.6.3).

1. Staver A.M., Gubareva N.V., Lyamkin A.I., Petrov E.A. // Fizika Goreniya i Vzryva. 1984. V.20. P.100-104.
2. Danilenko V.V. // Phys. Solid State. 2004. V.46. P.581-584.
3. Krueger A. // J. Mater. Chem. 2008. V.18. P.1485-1492.
4. Schrand A., Hens S.A.C., Shenderova O.A. // Crit. Rev. Solid State Mater. Sci. 2009. V.34. P.18-74.
5. Bondar V.S., Puzyr A.P. // Phys. Solid State. 2004. V.46. P.698-701.
6. Puzyr A.P., Bondar V.S. // RU Patent №2252192. Publ. 20.05.2005. Bulletin №14.
7. Puzyr A.P., Bondar V.S. // RU Patent №2258671. Publ. 20.08.2005. Bulletin №23.

8. Bondar V.S., Puzyr A.P. // Constructions from composite materials. 2005. №4. P.80-94.
9. Puzyr A.P., Purtov K.V., Shenderova O.A., Luo M., Brenner D.W., Bondar V.S. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2007. V. 417. № 1. P. 299-301.
10. Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S. // Diam. Relat. Mater. 2007. V.6. P.2124-2128.
11. Purtov K.V., Burakova L.P., Puzyr A.P., Bondar V.S. // Nanotechnology. 2008. V.19. P.1-3.
12. Bondar V.S., Pozdnyakova I.O., Puzyr A.P. // Phys. Solid State. 2004. V.46. P.737-739.
13. Bondar V.S., Puzyr A.P., Purtov K.V., Mogilnaya O.A., Vydryakova G.A., Tyulkova N.A., Podicheva E.K., Medvedeva S.I., Degermendzhi A.G., Gitelzon J.I. // Nanotechnologies in Russia. 2008. V.3. P.38-41.
14. Purtov K.V., Puzyr A.P., Bondar V.S. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2008. V.419. P.560-562.
15. Puzyr A.P., Bondar V.S., Purtov K.V. // RU Patent №2366713. Publ. 10.09.2009. Bulletin №25.
16. Puzyr A.P., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Tyan A.G., Selimhanova Z.Y., Manashev G.G., Bondar V.S. // Siberian Med. Rev. 2005. V.1. P.20-24.
17. Puzyr A.P., Bondar V.S., Selimhanova Z.Y., Injevatkin E.V., Bortnikov E.V. // Siberian Med. Rev. 2004. V.2-3. P.25-28.
18. Puzyr A.P., Bondar V.S., Selimhanova Z.Y., Tyan A.G., Bortnikov E.V., Injevatkin E.V. // Siberian Med. Rev. 2004. V.4. P.19-23.
19. Purtov K.V., Bondar V.S., Puzyr A.P. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2001. V.380. P.411-414.
20. Puzyr A.P., Pozdnyakova I.O., Bondar V.S. // Phys Solid State. 2004. V.46. P.740-742.
21. Purtov K.V., Petunin A.I., Burov A.E., Puzyr A.P., Bondar V.S. // Nanoscale Res. Lett. 2010. V.5. P.631-636.

STRUCTURE/FUNCTION ANALYSIS OF PHB DEPOLYMERASE PhaZ7 FROM *PAUCIMONAS LEMOIGNEI*

Jendrossek D., Hermawan S.

Institute for Microbiology, University Stuttgart, Germany

imbdj@imb.uni-stuttgart.de

The crystal structure of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 purified from *Paucimonas lemoignei* was determined at 1.90 Å resolution (1). The structure consists of a single domain with a α/β -hydrolase fold in its core. The active site is analogous to that of serine esterases/lipases and is characterized by the presence of a catalytic triad comprising Ser136, Asp242 and His306. Comparison with other structures in the Protein Data Bank showed high similarity of PhaZ7 with the *Bacillus subtilis* lipase LipA (2). Structural comparison with *Penicillium funiculosum* PHB depolymerase, the only other PHB depolymerase whose structure is known (3), revealed significant differences. The two enzymes appear to utilize different types of solvent-exposed residues for biopolymer binding, with aliphatic and hydroxyl residues used in *P. funiculosum* PHB depolymerase, and aromatic residues in PhaZ7 in a lid-like structure reminiscent of similar structures in many lipases. Effects of site-directed mutagenesis of several targets within the lid-like structure on activity of PhaZ7 will be shown.

- (1) Papageorgiou, A.C., Hermawan, S., Singh, C.B., and Jendrossek, D. 2008. *J. Mol. Biol.* **382**:1184-1194.

- (2) van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. E., and Dijkstra, B. W. (2001). *J. Mol. Biol.* **309**: 215-226.
- (3) Hisano, T. et al. (2006). *J. Mol. Biol.* **356**: 993-1004

BEYOND PEPTIDE DELIVERY: IMPROVING THE CONTROLLED RELEASE OF PROTEINS

Shwendtvan A.

*Cerenis Therapeutics, Ann Arbor, MI. Detroit. USA,
shenderova@gmail.com*

In the 1980s, the first long-term controlled-release peptide products were born, establishing the feasibility for small biomacromolecule controlled release. Since then, to meet a growing need to deliver macromolecular drugs, particularly proteins, there has been an ever growing interest to understand how to control the delivery of this special class of molecules from injectable biodegradable polymer dosage forms. Described here is research focused on overcoming several critical barriers to controlled release of proteins from injectable poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microsphere and cylindrical depots, including: 1) improving stability of PLGA-encapsulated proteins, 2) developing a novel microencapsulation method—self-encapsulation without organic solvents, and 3) performing mathematical modeling to control formulation and manufacturing parameters. For example, a model protein, bovine serum albumin (BSA), was employed to examine the cause of ubiquitous instability of proteins in PLGA. Triggered by an acidic pH in the aqueous polymer pores, BSA was found to unfold with ensuing hydrolysis and noncovalent aggregation. The acidic PLGA microclimate pH was also implicated in the instability of several other encapsulated proteins, such as basic fibroblast growth factor (bFGF) and tetanus toxoid, and these proteins were stabilized by co-encapsulating a poorly soluble base ($Mg(OH)_2$ or $MgCO_3$) in the polymer. The pH-modified PLGA implants also stabilize proteins in vivo. For example, excellent in vitro/in vivo correlations of PLGA-encapsulated BSA and the rescue of murine ischemic hindlimbs following implantation of stabilized PLGA-encapsulated bFGF have been documented. Other examples include i) manipulating spontaneous polymer chain rearrangements and aqueous pore closing to microencapsulate proteins in porous polymers by simple mixing of the protein and polymer, and ii) the accurate modeling of microclimate pH in PLGA films.

НАНОАЛМАЗЫ ВЗРЫВНОГО СИНТЕЗА В БИОТЕХНОЛОГИИ

Бондарь В.С.

*Институт биофизики СО РАН, 660036, Красноярск, Россия
bondvs@mail.ru*

Обсуждаются перспективы применения модифицированных нанодiamondов (МНА) взрывного синтеза, образующих свободнодисперсные системы, как наноматериала биотехнологического назначения. Физико-химические свойства МНА (сочетание химически полиморфной, активной поверхности и высокой коллоидной устойчивости в дисперсионных средах) открывают возможности их

применения в разработке и создании новых материалов и технологий для биологии, медицины, фармакологии, экологии.

Рассматриваются варианты практического использования МНА в биотехнологических целях. Сообщается о применимости МНА как полифункционального адсорбента для сепарации, выделения и очистки биомолекул из сложных смесей. Приводятся примеры использования МНА для эффективного выделения и очистки целевых белков из рекомбинантных источников и природных объектов в объеме и колоночной хроматографией обычного давления и дополнительной очистки белковых препаратов, производимых коммерческими фирмами. Обсуждаются преимущества технологий очистки белков с помощью МНА. Рассматриваются возможности применения МНА в технологиях молекулярной биологии и генной инженерии, основанные на способности наночастиц адсорбировать линейные и не связывать кольцевые формы ДНК. Демонстрируется применение МНА как основы для конструирования систем адресной доставки веществ (например, лекарственных препаратов) к биологическим мишеням. Приводятся примеры создания систем индикации и биохимической диагностики (включая многокомпонентные системы многоразового действия), посредством неспецифической адсорбции и ковалентной иммобилизации биомаркеров на поверхности МНА. Обсуждается возможность применения МНА для нейтрализации и дезактивации биотоксинов на примере адсорбции афлатоксина В1 и обнаруженной каталитической активности наночастиц в органических реакциях. На основании высоких адсорбционных качеств МНА к различным соединениям биологической и небиологической природы рассматривается возможность их применения в медицинских целях в качестве: нового адсорбента (и энтеросорбента) для связывания и нейтрализации нежелательных и токсичных соединений, носителя лекарственных препаратов для создания новых лечебных средств пролонгированного действия. Приводятся результаты исследований *in vivo* по изучению воздействия МНА на организмы экспериментальных животных при разных способах введения наночастиц, свидетельствующие о высокой биосовместимости и малой токсичности наноматериала.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (Государственный контракт № 02.513.11.3079), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06-04-90234), Президиума РАН (программа №21, проект 64 (3.6.3)).

ДОПУСК НОВЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ И МЕДИЦИНСКИХ УСТРОЙСТВ К ПРИМЕНЕНИЮ

Шишачкая Е.И.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. свободный.79
Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск. Академгородок 50, стр. 50
shishatskaya@inbox.ru*

Особенности разработки и применения новых материалов медицинского назначения заключаются в обязательности соблюдения требований, выдвигаемых к высокому уровню их безвредности. Это привело к разработке специальных подходов и процедур, необходимых для получения разрешения на их применение в медицине. Классификация

медицинских устройств и требования к масштабу и уровню их испытаний базируется на рисках, потенциально присущих каждому конкретному классу устройства:

- класс 1 - медицинские технологии с низкой степенью риска, включающий в себя прочие медицинские технологии;
- класс 2 - медицинские технологии со средней степенью риска, включающий в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на кожу, слизистые оболочки и естественные полости организма; терапевтические, физиотерапевтические и хирургические манипуляции в дерматокосметологии;
- класс 3 - медицинские технологии с высокой степенью риска, включающий в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на органы и ткани организма.

В зависимости от класса придаются различные уровни законодательных контрольных механизмов. В США регистрация медицинских устройств регулируется Администрацией по продуктам питания и препаратам (FDA); в Великобритании - Агентством по медицинским устройствам; в Японии - Министерством здравоохранения и социального обеспечения; в ЕС для изделий предусмотрена маркировка CE.

В США FDA классифицирует медицинские устройства по риску для пациента, связанному с использованием этого устройства. В Европе принята четырехуровневая система, основанная на степени риска, связанного с использованием устройства, времени, в течение которого устройство находится в контакте с организмом человека, и степени инвазивности устройства (Директива ЕС 93/42 «Медицинское устройство»). Изделия, соответствующие этим правилам, имеют марку «CE». В России с 1999 г. действует Международный стандарт ИСО 10993-99 по оценке биологической безопасности медицинских материалов и изделий, принятой в настоящее время в США и странах ЕС. В России был введен ГОСТ Р ИСО 10 993.99 «Оценка биологического действия медицинских изделий». В 2007 г. издан Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 488 "Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по выдаче разрешений на применение новых медицинских технологий".

Для регистрации новых медицинских технологий медицинского назначения и устройств и изделий для их реализации предусматривается проведение цикла исследований, включающих: проведение санитарно-химических, токсиколого-гигиенических исследований, санитарно-гигиеническую оценку изделия; проведение приемочных технических испытаний изделия; проведение медицинских испытаний изделия.

На первом этапе доклинических испытаний с применением современных физико-химических методов (хроматография, масс-спектрометрия и т.д.) оценивают материал и вытяжки из него; с использованием тест-объектов (изолированные органы животных, культуры тканей и клеток и т.п.) определяют возможность проявления цито- и тканетоксического действия; на лабораторных животных проводят токсикологические исследования. Результаты этого этапа, включающие санитарно-химические, цитотоксические, токсикологические и патоморфологические исследования, позволяют провести отбор соответствующего материала. Эти исследования, как правило, проводятся специальными сертифицированными лабораториями и организациями.

На втором этапе проводят токсиколого-гигиенические испытания макетных образцов, являющихся прототипами промышленных изделий, при изготовлении которых учитываются такие технологические условия как режимы переработки, условия стерилизации, условия хранения и т.п. На этом этапе используют те же методы, что и на первом этапе. При положительном прохождении данного этапа исследований изделия и материалы рекомендуются к клиническим испытаниям.

Клинические испытания, в свою очередь, состоят также из нескольких этапов (фаз):



На первом этапе новое медицинское изделие и технология его применения проверяются на 20-30 добровольцах с их информированного согласия в так называемых локальных исследованиях. Далее с разрешения надзирающих органов проводятся ограниченные клинические испытания с участием 300-500 добровольцев. В случае положительных результатов назначается расширенное клиническое исследование с участием не менее тысячи человек, которое проводится, как правило, в нескольких независимых клиниках. Только после получения достоверного доказательства положительных результатов подготавливается документация к регистрации изделия.

BIOCOMPATIBILITY OF BIOMATERIALS - TOXICOLOGICAL EVALUATION

Morgun V.N., Shishatskaya E.I.

Siberian Federal University, Krasnoyarsk, RF

For modern reconstructive technologies in medicine development of new biocompatible materials is the top task for the biotechnologic research. To improve the quality of life and treatment efficacy, we need new technologies using highly functional materials, including construction of systems reproducing biological functions of live organisms. This makes it necessary to investigate the mechanisms of compatibility of every new material with blood, tissues and the organism. There are two most valuable criteria for the implantable biodegradable medical devices - evaluation of their biofunctionality and biocompatibility. Biofunctionality is determined of devices lifetime, ability to bring the load and to lead native tissues for regeneration.

Biocompatibility of medical devices, including implants, is closely connected with its toxicity. Standard set of methods of toxicological evaluation for medical device includes: estimation of local tissue response, systemic response of the organism, tests of allergy and sensitization, carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects. In the work with biodegradable material response of the organism is considerably dependent on the composition of the biodegradation products, so the same value has preliminary estimation of material structure and chemical stability. So as most part of modern scaffold materials for regenerative and tissue engineering are biopolymers, we should take into account peculiarities of their derivation and processing. Depending on the class of biomedical device and its period of the contact with the inner mediums of organism in toxicological evaluation we may use an additional methods, such as investigation of leuko- and cardiotoxic effects.

EMERGING HEALTH ISSUES FROM CHRONIC PESTICIDE EXPOSURE: INNOVATIVE METHODOLOGIES AND EFFECTS ON MOLECULAR CELL AND TISSUE LEVEL

Tsatsakis A.

*Department of Forensic Sciences & Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece 71409
e-mail; aris@med.uoc.gr*

Principles and applications of biomonitoring for pesticide low level long-term exposure will be presented and ethical problems related to biomonitoring studies will be discussed. Pesticides have an impact on human health after exposure to very low doses from environmental origin or food supply, and the adverse health effects of mixtures of pesticides is still not known. Additive effects are possible with some pesticides; however, not all mixtures of similar pesticides produce additive effects. There is growing evidence that exposure to mixtures of different classes of pesticides may also elicit synergistic toxicity. Either synergistic or antagonistic effects can also occur if the individual pesticides in a mixture interact via toxicokinetic or toxicodynamic processes. Each of these possible outcomes (addition, synergism or antagonism) has also potentially important implications for regulatory actions. A great number of health problems are already associated with low level occupational pesticide exposure. Differences from pesticide exposure and related with this exposure health issues in Europe and in developing countries will also be evaluated. Biomarkers of exposure, of effect and of susceptibility will be discussed in the frame of symptoms, clinical findings and diseases. Innovative markers on molecular, cell and tissue level will be presented. Findings from an ongoing cross-sectional study on pregnant women and the neonates with documented prenatal pesticide low level chronic exposure will be reported in details. Studies of the impact of pesticides on fetus development and pregnancy outcome resulted to contradictory conclusions. Measurements of organophosphate metabolite levels in amniotic fluid and urine of pregnant women who undergone an amniocentesis for a variety of indications at the gestational age resulted in increased levels of DEDTP in cases when pre-term infants and altered somatometric parameters of the neonate were observed. Even very recent data indicate an effect of pesticides exposure during pregnancy to the fetus growth, further investigation is required due to the fact that fetal and neonate development is a multiplex process. Developmental neurotoxicity of pesticides has been identified as a specific area of concern in the recent revision of pesticide regulations in Europe. Agrochemical exposure in children and adolescents and the

spectrum of neurodevelopmental disorders that have been associated with this exposure will be summarized. Methodologies used to assess neurodevelopmental effects linked to pesticide exposure in epidemiology studies, as well as what can be concluded from their findings, will be critically appraised.

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА/4-ГИДРОКСИБУТИРАТА, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ Жила Н.О.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, 660041, пр. Свободный, 79,
Красноярск, Россия ²Институт биофизики СО РАН,
e-mail: nzhila@mail.ru

Цель работы - исследование закономерностей синтеза сополимеров 3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата водородокисляющими бактериями *Ralstonia eutropha* B5786 и физико-химических свойств.

Материалы и методы: Исследованы два штамма водородокисляющих бактерий: *Ralstonia eutropha* B5786 и *Cupriavidus eutrophus* B10646, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных продуцентов (ВКПМ). Для выявления условий максимального накопления полимеров с высоким содержанием 4-гидроксибутирата проведено экспериментальное моделирование различных по длительности режимов культивирования бактерий с подпиткой ко-субстратами при варьировании количества подпиток и их концентрации, а также исследовано влияние дополнительных ко-субстратов (пропионовая кислота, уксусная кислота) на включение фракции 4-гидроксибутирата в полимер. Свойства серии высокоочищенных образцов поли(3ГБ-со-4ГБ) исследованы с применением современных физических методов.

Результаты: Синтезировано семейство сополимеров с различным соотношением мономеров 3- и 4-гидроксимасляной кислоты (таблица).

Таблица – Состав и свойства сополимеров
3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата

Содержание 4ГБ, мол. %	Средневесовая молекулярная масса (M_w), Да	Степень кристалличности, %	Температура плавления, °C	Температура разложения, °C
0	1 300 000 ± 28 700	76	180	280
8.7	630 000 ± 3 500	44	171	286
10.7	1 110 000 ± 17 900	43	171.9	268
14.9	850 000 ± 12 200	44	168.9	264
16.0	970 000 ± 18 200	43	171.3	279
17.0	850 000 ± 24 200	25	172.5	271
24.3	540 000 ± 9 600	12	-	274

В исследованном диапазоне соотношения мономеров в сополимере (включение 4-гидроксибутирата варьировало от 8.7 до 24.3 мол.%) не обнаружено влияния этого параметра на молекулярную массу (M_w) и полидисперсность (ПД) сополимера. С использованием гелепроникающей

хроматографии определена молекулярная масса образцов сополимеров поли(ЗГБ-со-4ГБ) с различным соотношением мономеров. Среднечисловая молекулярная масса у различных образцов варьировала в диапазоне 230–480 кДа; средневесовая молекулярная масса составила 540–1110 кДа; полидисперсность - от 1.91 до 2.76 без четкой связи с содержанием 4-гидроксibuтирата в сополимере. Установлено, что включение 4-гидроксibuтирата резко (существенно в большей степени по сравнению с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом) влияет на соотношение кристаллической и аморфной зон в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего (таблица). Впервые удалось получить образцы ПГА, имеющие пониженную степень кристалличности (от 44 до 12%).

В результате выполненных исследований найдены условия культивирования водородокисляющих бактерий, позволяющие получать высокие общие выходы высокомолекулярного и низкокристаллического сополимера с включением 4-гидроксibuтирата свыше 20 мол. %.

Работа выполнена по гранту (Пост. Правительства РФ №220) «Биотехнологии новых biomатериалов») и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

СОЗДАНИЕ GMP ПИЛОТНОГО ПРОИЗВОДСТВА РАЗРУШАЕМЫХ БИОПЛАСТИКОВ

Шишацкий О.Н.

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия
shishatskii@mail.ru*

Создание новых материалов – одна из ключевых проблем современности. Мировая тенденция - постепенная замена синтетических пластмасс биопластиками, получаемыми биотехнологическими методами, без развития которых невозможны научно-технический прогресс и повышение качества жизни населения. В СФУ в рамках мега-проекта по Постановлению правительства РФ № 219 создается первое в РФ производство разрушаемых биопластиков по стандарту GMP. Необходимость создания современного биотехнологического производства биопластиков является актуальной задачей и позволяет реализовать уникальный для РФ инновационный потенциал, накопленный при сотрудничестве СФУ и Красноярского научного центра СО РАН.

Проект содержит комплекс НИОКР, включающий разработку исходных данных (ИД) для проектирования производства. Исходя из ИД, разработаны технологическая и аппаратная схемы; определены требования к оборудованию для основных стадий процесса. Анализ продукции мировых фирм – производителей ферментационного оборудования предусматривает приобретение современного оборудования, имеющего сертификат JMP. На базе полученных данных и составленной документации разработан проект ОПУ; определены требования к производственному помещению; составлен проект размещения и монтажа оборудования. Создание JMP ОПУ позволит выпускать продукцию для любых сфер применения, сертифицировать ее по международным стандартам, при серийном выпуске выходить на международный рынок.

СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И 3-ГИДРОКСИГЕКСАНОАТА БАКТЕРИЯМИ *R.EUTROPHA*

Сырвачева Д.А.

Сибирский федеральный университет,
г. Красноярск, Россия
e-mail: Syrvacheva-1989@yandex.ru

Полиэфиры микробного происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА) - вызывают большой интерес среди микробиологов, биотехнологов и материаловедов в качестве аналога не разрушаемых полиолефинов в связи с их способностью разрушаться в природной среде без образования токсичных продуктов, а также из-за возрастающих требований к охране окружающей среды. Основными тенденциями в современной индустрии полимеров является создание новых экологически чистых полимерных материалов с широким спектром полезных свойств. Направление поиска в последние годы смещается в сторону производства не аккумулируемых в природной среде материалов, разрушаемых в естественных биологических процессах, то есть вписывающихся в биосферные круговоротные циклы. В этой связи большую актуальность приобрели работы по биополимерам (полимерам биологического происхождения). В ходе разработки эффективных способов синтеза ПГА существенное внимание уделяется бактериям *Ralstonia eutropha* в связи со способностью аккумулировать ПГА с высокими выходами на различных субстратах. Способность этого микроорганизма синтезировать различные сополимеры вызывает большой интерес в связи с возможностью направленного получения полимеров с заданными свойствами. Сопolíмеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата (поли(3-ГБ-со-3-ГГ)) отличаются по физико – химическим свойствам от гомогенного поли-3-гидроксибутирата, они менее кристалличны, поэтому позволяют получить более технологичный полимер.

Цель работы - исследование способности бактерий *R. eutropha* B5786 синтезировать в автотрофных условиях сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата (поли(3-ГБ-со-3-ГГ)).

Методы и результаты: Проведено культивирование бактерий на смешанном углеродном субстрате, содержащем углекислоту и добавки гексановой кислоты как предшественника биосинтеза мономеров 3-ГГ. В ходе эксперимента в растущую при дефиците азота автотрофную культуру *R. eutropha* B5786, аккумулирующую полимер, вносили добавки гексановой кислоты в концентрации 0,5 г/л (рис.).

Ферментацию проводили в периодическом контролируемом режиме. Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после предварительного метанолиза образцов биомассы на хромато-масс-спектрометре GCD plus ("Hewlett Packard", USA). Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (4 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными холодильниками в течение 2 ч 40 мин. По окончании метанолиза в колбу добавляли двойной объем дистиллированной воды. При этом происходило разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

Результаты: Исследовано влияние добавки гексаноата на выход биомассы в культуре бактерий (рис). Из рисунка видно, что при концентрации гексановой кислоты 0,5 г/л концентрация клеток в культуре к концу культивирования составила 1,05 г/л. Следует отметить, что добавление гексаноата в среду в такой концентрации не ингибировало роста клеток.

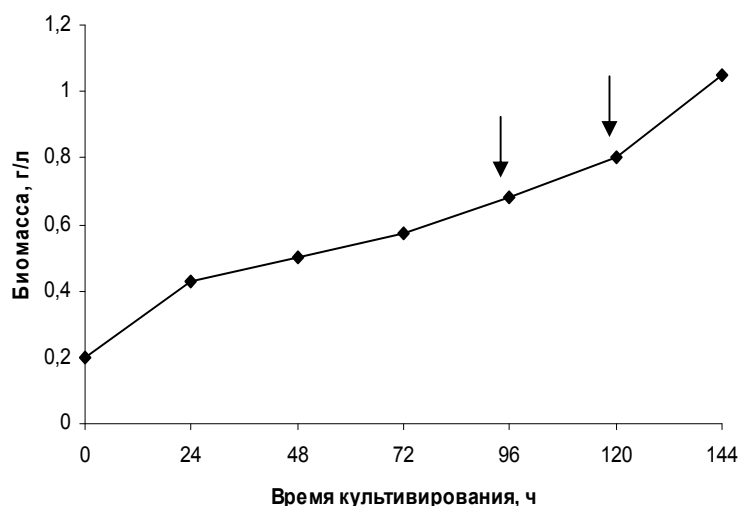


Рис. Динамика накопления биомассы *R. eutropha* B5786. Стрелками обозначено время добавления 3-гексановой кислоты (0,5 г/л)

В составе ПГА в выбранном режиме культивирования на комплексной С-субстрате в образуемом полимере зафиксированы регулярные включения 3 - гидроксигексаноата в концентрации свыше 6 мол % после первой добавки гексановой кислоты и в концентрации 9 мол % – после второй. Результаты определения концентрации биомассы в культуре бактерий, полимера в клетках и его химического состава показали, что доминирующей фракцией в сополимере является – 3 - гидроксibuтират, его содержание составило 91,7 мол %, в составе ПГА так же обнаруживаются включения 3 - гидроксивалерата. Однако его содержание не превышало 1,82 мол %. Содержание фракции 3-гидроксигексаноата (3-ГГ) в сополимере к концу культивирования было зафиксировано 8,9 мол %. Общий выход полимера составлял 46,2 % от веса сухой биомассы.

Таким образом, показано, что исследуемый штамм способен синтезировать сополимер 3 - гидроксibuтирата и 3 - гидроксигексаноата (поли(3-ГБ-со-3-ГГ) в автотрофных условиях. Знание закономерностей накопления ПГА дает возможности управления этим процессом и основу для синтеза полимеров с новыми свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов»)

СИНТЕЗ БИОРАЗРУШАЕМОГО СОПОЛИМЕРА 3- И 4-ГИДРОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (ПОЛИ(3-ГБ-СО-4-ГБ))

Осипова И.В.

Сибирский федеральный университет, Институт биофизики СО РАН,
г.Красноярск

e-mail: osipova.i@mail.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс природных внутриклеточных макромолекул, которые синтезируют прокариотические организмы в специфических условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного депо энергии и углерода.

Существенное внимание уделяется бактериям *Ralstonia eutropha* (бывшее систематическое название *Alcaligenes eutrophus*) в связи со способностью этих бактерий аккумулировать ПГА с высокими выходами на различных субстратах, в том числе различного состава (гомогенный поли(3-гидроксибутират) и более технологичные сополимеры 3-гидроксибутирата с 3-гидроксигексаноатом (поли(3-ГБ-со-3-ГГ)), сополимеры 3- и 4- гидроксимасляной кислоты (поли(3-ГБ-со-4-ГБ)). Для сополимера поли(3-ГБ-со-4-ГБ) характерны высокие скорости биodeградации *in vivo* и в окружающей среде, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных ПГА. Данный сополимер является одним из перспективных, но трудно синтезируемым и мало изученным представителем семейства ПГА.

Цель работы - изучение способности бактерий штамма *R. eutropha* B5786 синтезировать в гетеротрофных условиях сополимеры 3- и 4-гидроксимасляной кислоты и выявление связи между условиями биосинтеза и структурой сополимера.

Материалы и методы: Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0.5-1.0 л, заполненных культурой на 50-60% объема, на термостатируемой качалке при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля. При гетеротрофном культивировании для штамма *R. eutropha* B5786 ростовым субстратом и источником углерода приняты фруктоза (10-12 г/л) и масляная кислота (1 г/л). В качестве субстрата-предшественника для образования мономеров 4-гидроксимасляной кислоты использовали γ -бутиролактон в концентрациях (2-10 г/л) и/или 1,4-бутандиол (2-20 г/л).

Результаты: Установлено, что 1,4-бутандиол не ингибировал рост бактерий. При концентрации 1,4-бутандиола, равной 20 г/л, урожай биомассы составил 1,6 г/л, но содержание ПГА было минимальным низким (12,4 %) (Таблица 1).

В качестве доминирующего мономера в полимере идентифицирован 3-гидроксибутират (3-ГБ); его доля в полимере составила свыше 98 мол%), и в качестве минорного включения – 3-гидроксиивалерат (3-ГВ) (0,3-1,1 мол%). Отмечено, что при увеличении концентрации 1,4-бутандиола в культуре возрастала доля гидроксигексаноата (3-ГГ), однако при этом не удалось добиться включения фракции 4-гидроксибутирата (4ГБ) в сополимер.

Таблица 1.

Соотношение мономеров в полимере у штамма *R. eutropha* B5786 при различной концентрации 1,4- бутандиола в среде

Концентрация, 1,4- бутандиола, г/л	ПГА, % АСБ	Состав ПГА: Мол. %		
		3ОНС ₄	3ОНС ₅	3ОНС ₆
2	27,9	98,4	0,3	1,3
5	22,8	97,2	1,2	1,6
10	20,2	86,4	0,8	12,8
20	12,4	84,5	1,1	14,4

Исследовано влияние концентрации γ -бутиролактона на выход биомассы в культуре, продукцию и состав синтезируемого полимера. При увеличении концентрации бутиролактона в срезе в результате ингибирующего эффекта последнего урожай клеток снижался. Так, при максимальной концентрации бутиролактона в среду (10 г/л) выход биомассы был минимальным (4,5 г/л) (Рис.).

Синтезированный ПГА на среде с γ -бутиролактоном в концентрации 2-10 г/л содержал в сополимер два мономера - 3-ГБ и 4-ГБ. В качестве доминирующего мономера идентифицирован 3-гидроксibuтират (его доля в полимере составляла свыше 97 мол%) и в качестве минорного включения – 4-ГБ (0,9-1,6 мол%) (Таблица 2).

Таблица 2

Соотношение мономеров в полимере у штамма *R. eutropha* B5786 при использовании в качестве ко – субстрата бутиролактона

Концентрация бутиролактона, г/л	Состав полимера, мол.%		
	3ОНС ₄	3ОНС ₅	4ОНС ₄
2.0	98.6	0.5	0.9
6.0	97.9	0.7	1,4
10.0	98.0	0.4	1,6

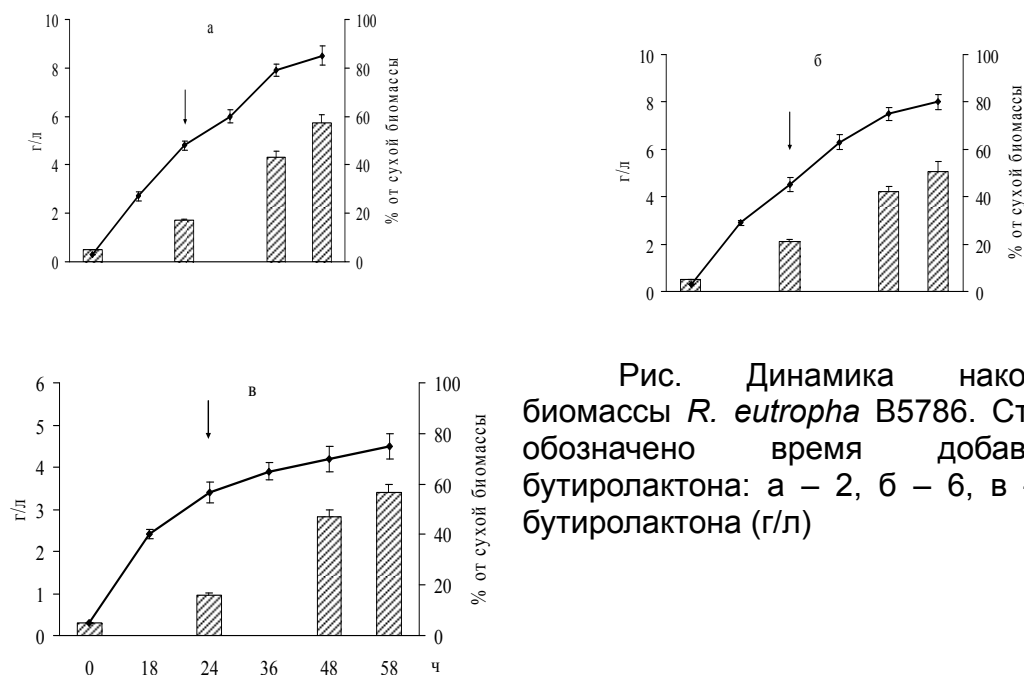


Рис. Динамика накопления биомассы *R. eutropha* B5786. Стрелкой обозначено время добавления бутиролактона: а – 2, б – 6, в – 10 г/л бутиролактона (г/л)

Установлено, что оба типа углеродного субстрата ингибировали рост бактерий и синтез ПГА. При использовании в качестве ко-субстрата γ -бутиролактона в концентрациях 2-6-10 г/л удалось синтезировать сополимер 3-ГБ и 4-ГБ. Результаты являются основой для полседующей оптимизации процесса биониснетза сополимеров с более высоким включением фракции 4-ГБ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов»)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РЕЗОРБИРУЕМЫХ ПГА РАЗЛИЧНОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

Николаева Е.Д.¹, Шишацкая Е.И.^{1,2}

²Институт биофизики СО РАН, Академгородок 50г. Красноярск, Россия
Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

Успех использования методов тканевой инженерии, ориентированной на создание конструкций, обеспечивающих восстановление, укрепление и улучшение функций тканей и органов, во многом зависит от свойств материалов, используемых в качестве носителя для культивирования клеток. Требованиями к таким материалам, помимо прочности и легкости переработки,

включают биodeградируемость и биосовместимость, способность стимулировать пролиферацию и дифференциацию клеток.

В настоящее время для клеточных матриксов исследуются разные высокомолекулярные материалы, среди которых особое место занимают полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные биodeградируемые и биосовместимые полиэфиры бактериального происхождения. ПГА обладают спектром полезных свойств, что делает возможным их применение в технологиях клеточной и тканевой инженерии для регенерации поврежденных кожных покровов, закрытия дефектов мягких и костной тканей, изготовления имплантатов кровеносных сосудов и клапанов сердца и др. В зависимости от состава ПГА мономеров обладают разными физико-механическими свойствами; среди них спектр материалов, - от высококристаллических термопластов до эластомерных сополимеров. Однако биосовместимость сополимеров новых типов изучена недостаточно.

Цель работы – конструирование и сравнительное исследование свойств матриксов из ПГА различного химического состава для культивирования клеток.

Материалы и методы: В работе использована серия образцов ПГА, полученных в Институте биофизики СО РАН: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты, сополимеры 3-гидроксимасляной кислоты с 3-гидроксивалериатом, с 3-гидроксигексаноатом, с 4-гидроксимасляной кислотой.

Состав и структуру полимеров определяли газовой хроматографией, рентгеноструктурным анализом, гельпроникающей хроматографией, термические свойства – методом ДСК. Матриксы в виде пленок получены методом полива растворов ПГА и техники испарения растворителя. Микроструктуру матриксов определяли с применением растровой электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии; свойства поверхности - на основе измерений контактного краевого угла смачивания водой. Адгезионные свойства матриксов и пролиферативный потенциал клеток определяли на примере клеток линии фибробластов мыши NIH 3T3. Культивирование клеток на матриксах проводили в течение 7 дней. Для подсчета клеток и анализа морфологии клеток проводили окрашивание клеток на матриксах азур-эозином и флуоресцентным красителем DAPI. Пролиферацию клеток определяли в МТТ-тесте.

Результаты: Изготовлены матриксы из ПГА разной химической структуры. Анализ микроструктуры матриксов показал, что наиболее ровная поверхность была у сополимеров с 3-гидроксивалериатом, наиболее рельефная – у сополимеров с 3-гидроксигексаноатом (Рис.1).

Снижение величин контактного краевого угла смачивания водой у сополимеров по сравнению с гомополимером 3-ГБ показало, что они более гидрофильны и предпочтительны в качестве опорных клеточных матриксов.

Все представленные типы ПГА поддерживали адгезию и пролиферацию клеток, при этом на всех матриксах фибробласты сохраняли морфологию, типичную для активного состояния на протяжении всего эксперимента (Рис. 2).

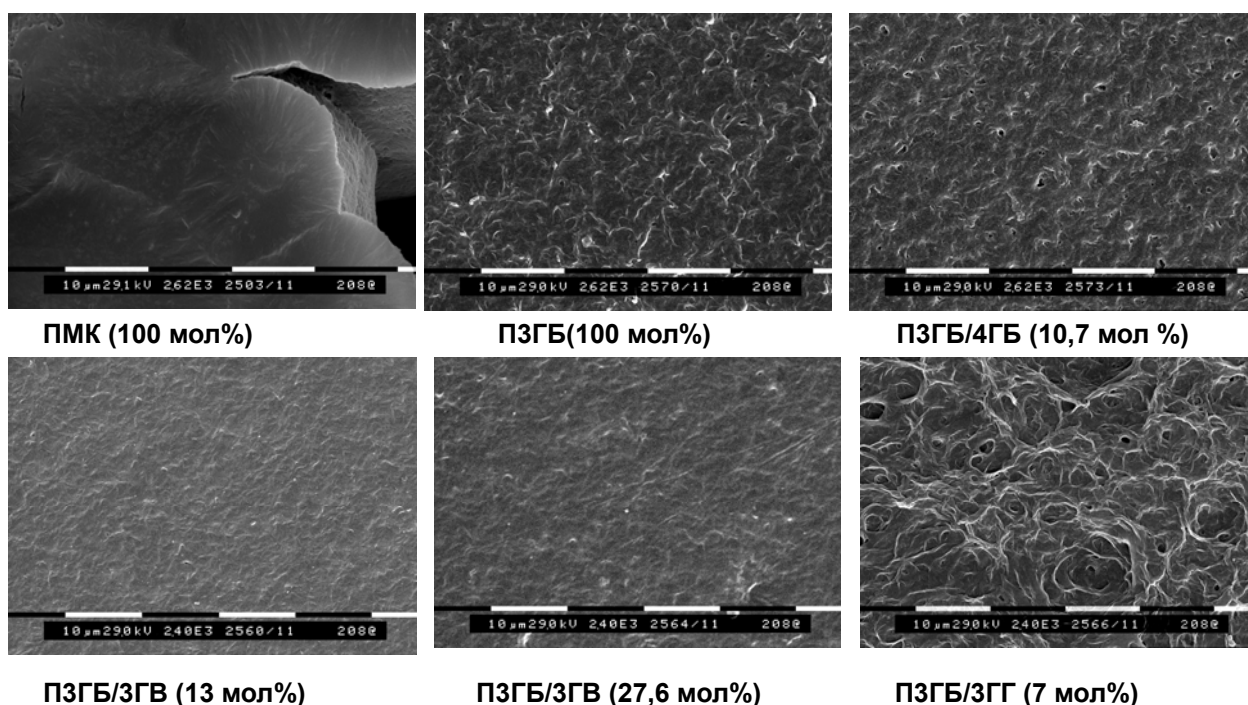


Рис. 1. РЭМ снимки матриц из ПГА различного химического состава; контроль - полилактид (ПМК)

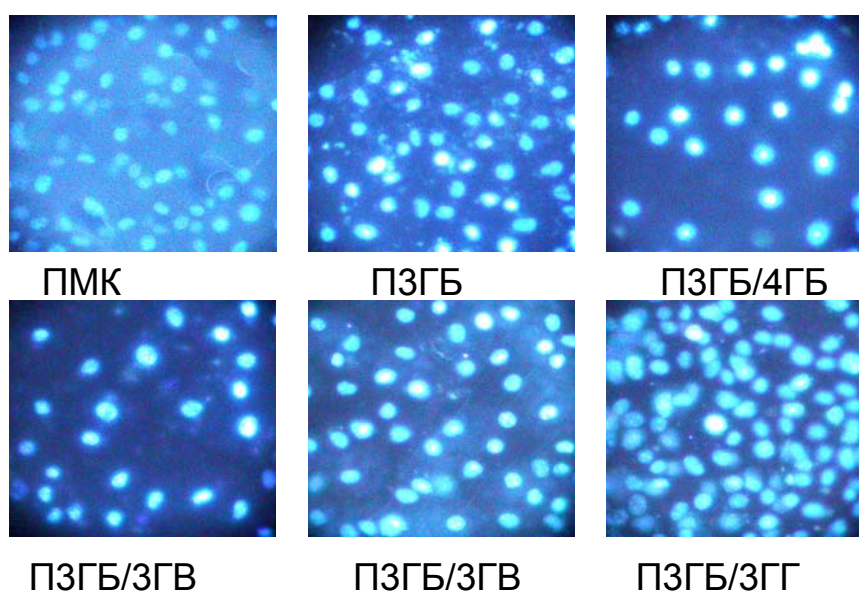


Рис. 2. Окраска DAPI фибробластов NIH 3T3, растущих на матрицах из ПГА разных типов; контроль – полилактид (ПМК)

Результаты работы показали, что все исследованные типы ПГА могут быть использованы для конструирования клеточных матриц.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов»)

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ ПГА БИМЕДИЦИНСКИХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ЗАДАЧ КЛЕТОЧНОЙ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Шумилова А. А.¹, Николаева Е.Д.²

¹*Сибирский Федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail: ann29402565@yandex.ru*

²*Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Академгородок-
e-mail: 50shishatskaya@inbox.ru*

Достижения клеточной и тканевой инженерии открыли широкие перспективы для создания принципиально новых и эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным решение многих проблем восстановления поврежденных тканей и органов и лечения ряда тяжелых заболеваний человека. Тканевая инженерия в настоящее время является одной из наиболее молодых и перспективных отраслей в медицине, базирующейся на принципах молекулярной и клеточной биологии. Используемый в ней междисциплинарный подход направлен на создание биокомпозиционных материалов для восстановления утраченных функций отдельных тканей или органов в целом. Основные принципы данного подхода заключаются в разработке и применении при имплантации в поврежденный орган или ткань носителей из биodeградирующих материалов, которые используются в сочетании либо с донорскими клетками или с биоактивными веществами. Среди материалов, разрабатываемых и исследуемых применительно к этим задачам, - полигидроксиалканоаты (ПГА). Это линейные биосовместимые и биоразрушаемые полиэфиры микробиологического происхождения. Полигидроксиалканоаты самостоятельно могут выполнять роль каркаса (матрикса), а также использоваться в сочетании (композиции) с различными материалами для улучшения физико-механических свойств.

Цель настоящей работы - получение из полигидроксиалканоатов биомедицинских конструкций в качестве матриксов для клеточной и тканевой инженерии и изучение их свойств.

Материалы и методы: Для исследований были взяты образцы гомогенного полимера 3-гидроксимасляной кислоты (П-3-ГБ) и двухкомпонентного сополимеры 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата П(3-ГБ/3-ГВ) с различным включением 3-ГВ: 11.2, 23.1 и 33 мол %, синтезированные в Институте биофизики СО РАН. Для конструирования объемных пористых матриксов в качестве основы использована коллагеновая гемостатическая губка (ОАО "Лужский 3-д Белкозин"). Объемные пористые матриксы коллаген-ПГБ готовили методом пропитки коллагеновой губки растворами полимера в хлороформе различной плотности (1, 3 и 5 %). По предварительным экспериментам оптимальным временем для пропитки губки определены 30 мин. Исходная коллагеновая губка имела размеры 10 x 5 x 10 мм. После пропитки различными растворами полимера образцы сушили на воздухе 24 ч. Анализировали влагопоглощение и суммарную пористость матриксов. Подсчет клеток проводили на 7 и 14 день. Снятие клеток с матриксов осуществляли трипсином в течение 5 минут, затем трипсин был нейтрализован средой. Отбирали по 0,5 мл клеточной суспензии. Собранные клетки окрашивали трипановым синим и подсчитывали с использованием камеры Горяева.

Результаты: Наибольший показатель суммарной пористости ($0,65 \pm 0,12$ см³/г) имела коллагеновая губка, пропитанная 1 %-м раствором полимера. Показатель влагопоглощения коллаген-полимерных матриксов для растворов в 3 и 5 % имел близкие значения ($44,3 \pm 0,23$; $49,2 \pm 0,185$ %) в отличие от матриксов, пропитанных 1 %-м раствором полимера ($79,8 \pm 0,25$ %). В гибридном матриксе коллаген-П-3-ГБ (пропитанный 3 и 5% растворами полимера) это значение было немного ниже ($32,5 \pm 0,25\%$; $38,5 \pm 0,20\%$).

Таким образом, поли-3-гидроксibuтират и фирменная коллагеновая губка позволяют получать объемные пористые клеточные матриксы.

Существенным вопросом является возможность стерилизации матриксов без нарушения их структуры и деградации материала. Показано, что для стерилизации разработанных матриксов пригодны сухо-жаровая стерилизация, которая не вызывала изменения внешнего вида и структуры матрикса. Автоклавирование вызывало сильную деформацию коллаген-полимерного матрикса, при этом исходная губка (не пропитанная полимером) полностью разрушилась.

Функциональные свойства матриксов исследованы в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3. Засев производили из расчета 6×10^3 на одну губку. Губки, пропитанные растворами полимера разной плотности и засеянные клетками, размещали в чашках Петри (3 матрикса/чашка), содержащих 10 мл среды (ДМЕМ, сыворотка теленка 10 %, раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед/л, стрептомицин 100 мкг/л)) (реактивы Sigma-Aldrich).

Через 7 суток после засева число клеток на композитном матриксе, пропитанном 1 %-м раствором П-3-ГБ, составило 200 000 кл/см² матрикса; на матриксах, пропитанных более плотными полимерными растворами (3 и 5%), количество клеток было близким, соответственно, 160 000 и 150 000 кл/см². На 14 день количество клеток на всех композитных матриксах было практически одинаковым, порядка 500 000 кл./см² матрикса.

В целом, выполненные исследования показали возможность получения объемных пористых матриксов, в том числе композитных, пригодных для выращивания клеток.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ НА СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ МАТРИКСОВ ИЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Николаева Е.Д.^{1,2}, Гончаров Д.Б.¹

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН,
Академгородок 50, стр. 50, г. Красноярск, Россия
e-mail: nikolaeva-lena@mail.ru

Актуальным направлением современной восстановительной медицины являются клеточная и тканевая инженерия, ориентированные на получение биологических заместителей тканей и органов. Наиболее эффективны методы, использующие опорные носители для клеток – матриксы (scaffold).

В настоящее время для создания матриксов исследуются различные материалы, включая металлы, керамики, искусственные и натуральные полимеры. Среди последних перспективны полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные биodeградируемые и биосовместимые полиэфиры микробиологического происхождения.

Свойства поверхности матриксов играют большую роль для прикрепления и пролиферации клеток. Поскольку ПГА гидрофобны, необходима дополнительная обработка для повышения адгезионных свойств поверхности матриксов.

Один из современных подходов, применяемых для модификации поверхности клеточных матриксов, заключается в обработке газовой плазмой. Плазменная обработка представляет интерес не только как средство модификации свойств поверхности, но также и как средство стерилизации, необходимой для медицинских изделий, контактирующих с внутренней средой организма. Важным моментом является устойчивость материалов матриксов к воздействию стерилизующих агентов.

Цель данной работы – создание опорных матриксов из ПГА для культивирования клеток и исследование влияния обработки H_2O_2 -плазмы на свойства поверхности.

Материалы и методы: Исследованы образцы ПГА, полученные в Институте биофизики СО РАН (марка «Биопластотан»): полимер 3-гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтират, 3-ПГБ), сополимер 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата, 3-ПГБ/3-ПГВ (включение 3-гидроксивалерата 9,9 мол %). Для получения матриксов в виде пленок были использованы образцы чистых полимеров и смеси полимеров с полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Матриксы в виде пленок получены методом разлива растворов полимера в формы с последующим испарением растворителя; объемные матриксы – прессованием измельченного полимера; матриксы из нетканого волокна были сформированы ультратонкими полимерными волокна (даметром 2-3 мкм), полученных методом электростатического формования (ЭСФ). Стерилизацию матриксов проводили в автоклаве и плазменном стерилизаторе Sterrad NX (США). Гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности матриксов определяли по измерению контактных краевых углов смачивания водой. Микроструктуру поверхности матриксов и морфоологию адгезированных клеток изучали с применением РЭМ. Биосовместимость матриксов оценивали в культуре фибробластов мыши линии NIH 3T3. Культивирование клеток на матриксах проводили в течение 7 дней. Адгезию клеток определяли визуально подсчетом трипсинизированных с поверхности матриксов клеток. Жизнеспособность клеток, культивируемых на матриксах разных типов, изучали в МТТ-тесте.

Результаты: Получены и исследованы матриксы из ПГА разных типов: в виде пленок, пористых мембран, объемных прессованных форм, нетканого полотна на основе ультратонких волокон. С применением РЭМ выявлены отличия в структуре поверхности матриксов (рис.1). Измерение контактных углов смачивания водой поверхности исходных, автоклавированных и обработанных плазмой матриксов, показало увеличение гидрофильности поверхности после H_2O_2 -плазменной обработки.

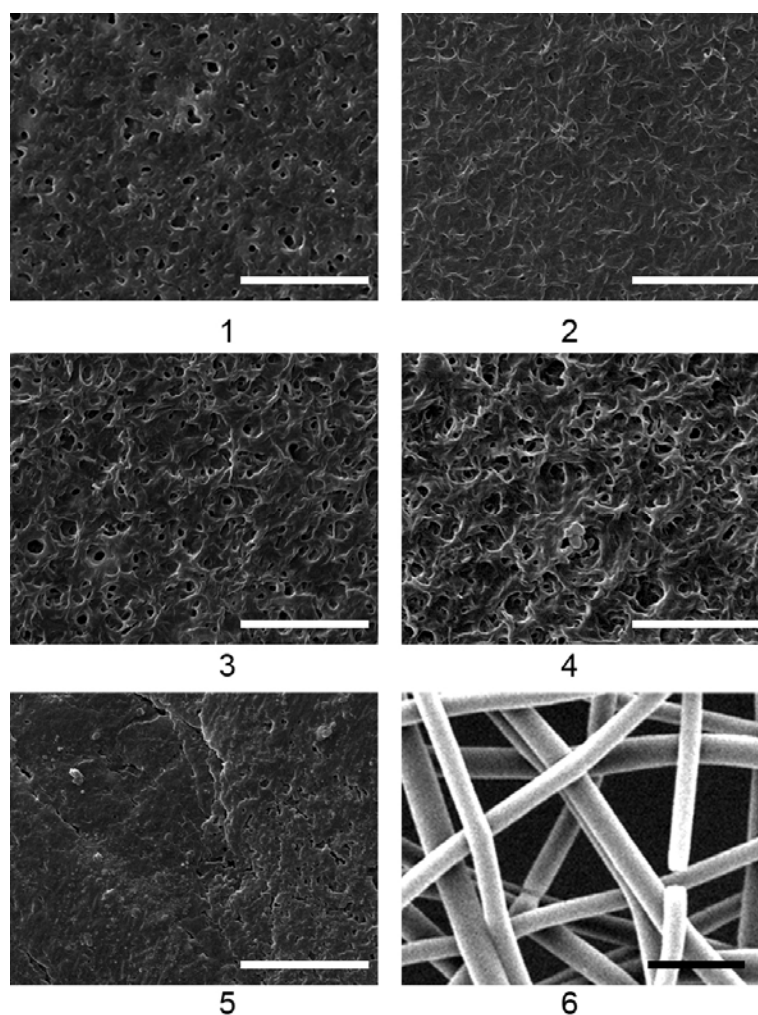


Рис. 1. РЭМ изображения матриц, изготовленных из «Биопластотана»: 1 – пленка 3-ПГБ; 2 – пленка 3-ПГБ/3-ПГВ; 3 – пленка 3-ПГБ+ПЭГ; 4 – пленка 3-ПГБ/3-ПГВ+ПЭГ; 5 – прессованный образец 3-ПГБ; 6 – нетканное волокно 3-ПГБ. Маркер – 10 мкм

Стерильные матрицы были засеяны фибробластами мыши линии NIH 3T3. На пленочных матрицах, изготовленных из П-3-ГБ и сополимера П-3-ГБ/3-ГВ, а также с добавлением ПЭГ, простерилизованных плазменной обработкой, клетки были хорошо распластаны, формировали монослой, среди них преобладали клетки веретенообразной формы. На аналогичных матрицах, но простерилизованных с применением автоклавирования, клеток было в 2-3 раза меньше, и они характеризовались неправильной формой (Рис. 2). На нетканых матрицах, сформированных ультратонкими волокнами, морфология клеток была наиболее сходной с морфологией клеток в контроле. На данном типе матриц преобладали клетки активной звездчатой формы; клетки проникли во внутренние слои матрикса, их пролиферация сопровождалась образованием межклеточного вещества, и это было более выраженным на матрицах, обработанных плазмой.

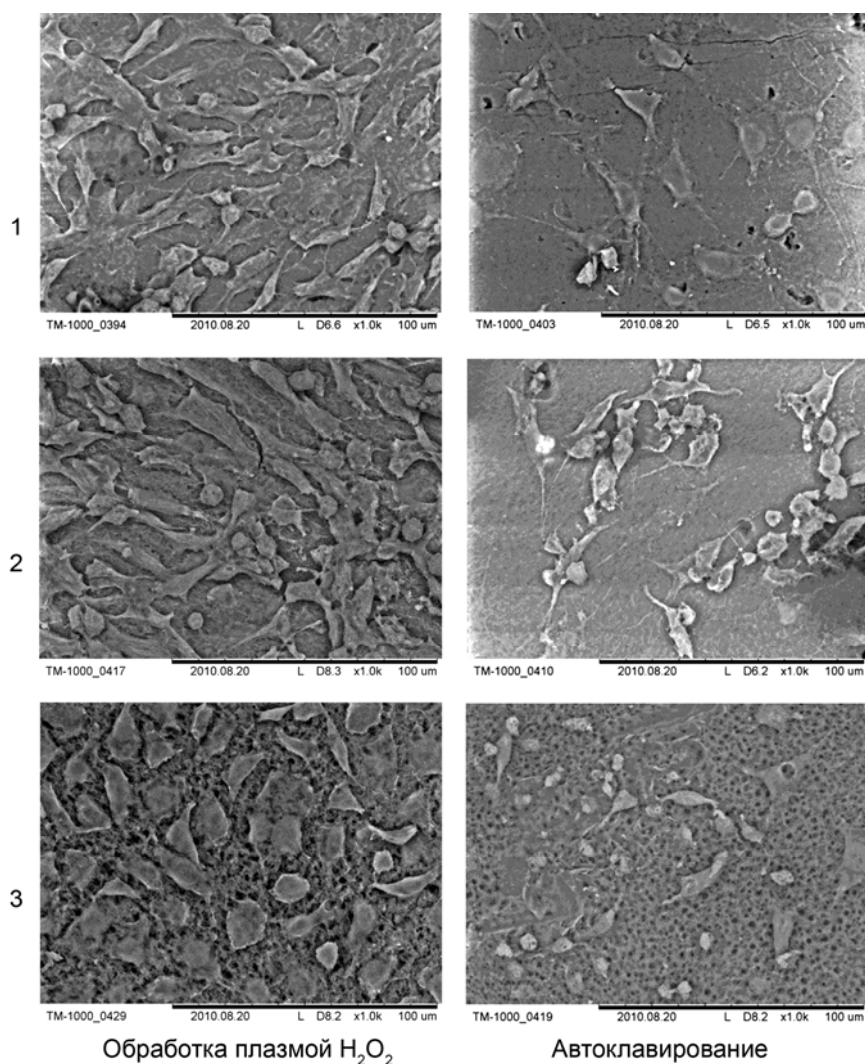


Рис.2. РЭМ снимки фибробластов мыши линии NIH 3T3 на матриксах, стерилизованных H₂O₂-плазмой и автоклавированием: 1-пресованная форма, 2- пленка, 3-мембрана

В целом, показано благоприятное влияние обработки поверхности плазмой H₂O₂ на адгезию и пролиферацию клеток по сравнению со стерилизацией матриц автоклавированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов»

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ В КАЧЕСТВЕ РЕЗОРБИРУЕМОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ И ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.В. Горева¹, Е.И.Шишацкая^{1,2}

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Академгородок 50; ²Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Россия
e-mail: goreva_a@mail.ru

Конструирование полимерных носителей («платформ») для депонирования и доставки лекарственных средств является актуальным и быстро развивающимся направлением современной биотехнологии и экспериментальной фармакологии. Разрабатываемые в настоящее время долговременные лекарственные системы (в англоязычной литературе – “drug delivery control systems”, DDS) продлевают действие и увеличивают биодоступность лекарственного вещества, обеспечивают направленный транспорт препарата к очагу патологического процесса, а также снижают возможные побочные эффекты. Ключевым моментом для создания таких систем является материал, используемый в качестве носителя. Материалы, необходимые для конструирования долговременных лекарственных форм, должны быть безвредны для организма и обладать комплексом физико-механических и медико-биологических свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость *in vivo*.

Последнее десятилетие свидетельствует о большом количестве исследований, направленных на создание новых систем доставки лекарств с использованием резорбируемых полимеров (полилактиды, полигликолактиды). С недавних пор возрос интерес к полимерам микробиологического происхождения – полигидроксиалканоатам (ПГА), которые имеют широкие перспективы для применения в медицине и фармакологии.

Цель работы - исследование полигидроксиалканоатов для депонирования и доставки лекарственных средств; оценка их биосовместимости и функциональных свойств.

Материалы и методы: В работе исследовано влияние техники изготовления (тип эмульсии, состав полимерной системы, способ микронизации, химический состав полимера, молекулярная масса лекарственного препарата) на выход, структуру и размер микрочастиц, получаемых из резорбируемых ПГА.

Результаты: Выявлены факторы, определяющие свойства микрочастиц из ПГА, и показано, что варьируя параметрами процесса изготовления, можно получать микрочастицы с различными характеристиками, пригодные для депонирования лекарственных препаратов и регулирования скорости их оттока в среду. Установлено, что наиболее значимыми факторами, влияющими на размеры микрочастиц из ПГА, являются концентрация раствора полимера и способ микронизации полимерной эмульсии. Структура поверхности частиц в значительной мере зависит от химического состава полимера.

Получено семейство микрочастиц диаметром от 10-200 нм до 50-100 мкм (Рис.). Исследована динамика выхода препаратов из матрикса микрочастиц *in vitro* и показано, что отток препаратов в среду возрастает с увеличением содержания 3-гидроксивалерата в сополимере 3ПГБ/3ПГВ, массовой доли препарата, пористости и уменьшения размеров частиц.

Далее был выполнен цикл исследований по проверке биосовместимости и лекарственной эффективности разработанной лекарственной формы.

Для оценки биосовместимости стерильные микрочастицы были введены в бедренную мышцу крысам. В ходе эксперимента исследована реакция тканей и общее состояние периферической крови животных. Формула периферической крови у экспериментальных животных не отличалась от животных контрольной группы. Сдвигов в лейкоцитарной формуле после введения микрочастиц животным не зафиксировано. Отмечена незначительная воспалительная реакция на начальных сроках (первые 2 недели) с нарастающей во времени макрофагальной инфильтрацией и образованием гигантских клеток инородных тел, резорбирующих ПГА.

В ходе эксперимента отмечено уменьшении фракции крупных частиц, что свидетельствует о протекании процесса разрушения полимерного матрикса. При этом в течение длительного периода наблюдения (до 12 недель) в тканях зафиксировано наличие не разрушенных частиц, что свидетельствует о достаточно длительном процессе биорезорбции микрочастиц из ПГА *in vivo* и пригодности использования полигидроксibuтирата для долговременной лекарственной формы при внутримышечном введении.

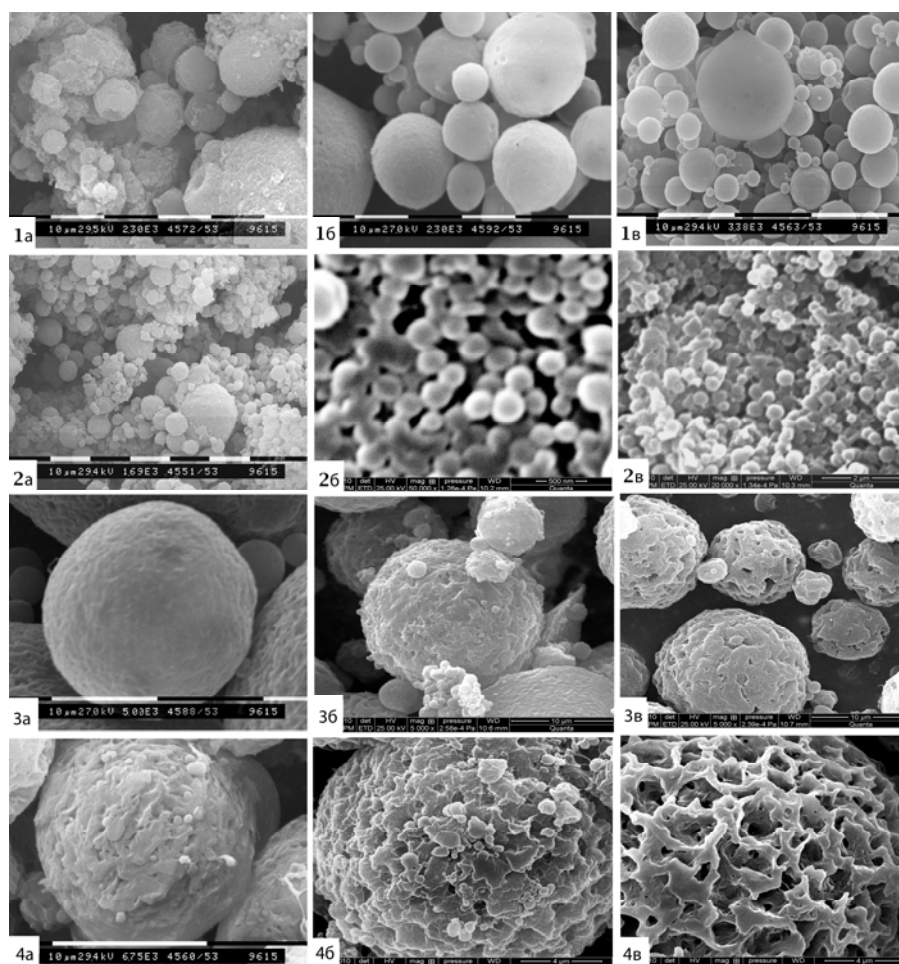


Рис. Семейство микрочастиц, полученных различными методами из ПГА различного химического состава

Для изучения возможности введения микрочастиц в кровь были изготовлены микрочастицы из П-3-ГБ, меченного по ^{14}C . По результатам регистрации радиоактивности тканей показано, что накопление метки ^{14}C происходит с различной интенсивностью в различных органах и изменяется с

увеличением длительности наблюдения. Основной мишенью для накопления метки ^{14}C являются ткани печени, селезенки, а также почек. Сопоставление уровня радиоактивности тканей с остаточным содержанием в них высокомолекулярного полимерного матрикса показало, что наиболее активный метаболизм и разрушение П-3-ГБ происходит в печени и селезенке.

На различных сроках наблюдения из отобранных образцов тканей внутренних органов экстрагировали остаточный полимер и определяли его количество и молекулярную массу. С использованием ВЭЖХ установлено, что за исключением тканей легких, разрушения полимера имеет место уже через 3 ч после введения микрочастиц в кровотоки; через 12 недель величина M_w полимерного матрикса микрочастиц не превышает 20-30 % от исходной величины. Обнаруженное через 12 недель после введения микрочастиц присутствие части не разрушенного полимера в тканях органов свидетельствует о длительности процесса разрушения П-3-ГБ и, следовательно, возможности длительного функционирования микрочастиц как средства доставки лекарственных препаратов к внутренним органам.

Лекарственная эффективность разработанной формы рубомицина в виде микрочастиц исследована на модели животных с привитой асцитной карциномой Эрлиха (АКЭ). Прививку АКЭ проводили в дозе, вызывающей 100 % смертность животных. Экспериментальной группе одновременно с АКЭ внутрибрюшинно однократно были введены микрочастицы с рубомицином. Рубомицин детектировался в крови и перитонеальной жидкости животных в ходе всего эксперимента. Анализ динамики численности животных, объема опухоли и концентрации клеток в асцитной жидкости показал возможность местного введения и возможность применения разработанной формы инкапсулированного рубомицина в виде полимерных микрочастиц для ингибирования развития АКЭ.

Таким образом, в настоящей работе разработана пролонгированная лекарственная форма цитостатического препарата в виде полимерных микрочастиц; доказана возможность введения микрочастиц внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, а также длительность функционирования лекарственной формы до 12 недель. На примере модели животных с экспериментальной формой АКЭ доказана противоопухолевая эффективность рубомицина, инкапсулированного в полимерный матрикс с возможностью местного введения в отличие от растворимого препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов») и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 93).

ОЦЕНКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ИЗ ПГА, НАГРУЖЕННЫХ РУБОМИЦИНОМ, НА ЖИВОТНЫХ С МОДЕЛЬЮ СОЛИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Кузьмина А.М.¹, Горева А.В.^{1,2}

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

²Институт биофизики СО РАН, г.Красноярск, Академгородок 50/50,
e-mail: anytka712@mail.ru

В современной биотехнологии и фармакологии приоритетным направлением является разработка новых подходов к созданию лекарственных систем пролонгированного действия, с возможностью адресной доставки препарата. Наиболее перспективными считаются системы в виде биodeградируемых микросфер и микрокапсул, которые пригодны для депонирования широкого спектра препаратов и могут быть введены в организм различными путями. Такие системы особенно актуальны для лечения онкологических и длительно текущих инфекционных заболеваний. Лекарственные средства, депонированные в полимерный матрикс, не оказывают общего токсического действия на организм и обеспечивают длительное поддержание требуемого уровня лекарственного препарата на необходимый период времени. Перспективным материалом для создания таких систем являются полигидроксиполы (ПГА) – природные полимеры, обладающие комплексом необходимых физико-механических и медико-биологических свойств, включая деградируемость в биологических средах.

Цель работы - разработка долговременной лекарственной формы доксорубина на основе ПГА и исследование *in vivo* ингибирования солидного варианта карциномы Эрлиха (КЦ).

Материалы и методы: В качестве полимерного носителя был взят полимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксибутират, П-3-ГБ). Образцы ПГБ синтезированы по технологии Института биофизики СО РАН; в качестве цитостатического препарата исследован противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда – Доксорубин-ЛЭНС (DOX)(ООО «ЛЭНС-Фарм»). Методом испарения растворителя из двухкомпонентной эмульсии П-3-ГБ получены микросферы (средний диаметр $0,34 \pm 0,03$ мкм), нагруженные препаратом (5 % от массы полимерного матрикса).

Лабораторным белым мышам линии Balb/c массой 20-23 г вводили клетки КЭ в количестве 2,5 млн на одно животное для формирования модели солидной формы опухоли. В эксперименте было задействовано 4 группы животных, которым была привита КЭ в одинаковой дозе: отрицательный контроль - животные с развитием опухоли без применения цитостатического препарата; положительный контроль - животные с внутривенным введением свободного доксорубина (еженедельное введение 0,2 мг); две экспериментальные группы – животные с введением одной ($0,75 \text{ мг/м}^2$) и двух курсовых ($1,5 \text{ мг/м}^2$) доз препарата в виде полимерных микрочастиц местно (в области формирования опухоли). Длительность наблюдения составила 28 суток, в том числе 21 суток - от начала терапии.

Показателем эффективности действия лекарственной формы доксорубина *in vivo* служили состояние животных исследуемых групп и состав периферической крови. Гистологической техникой оценивали развитие и купирование опухолевого процесса (изменение диаметра бедра, гистология

тканей - некроз ткани опухоли, лимфацитарная инфильтрация, полнокровие капилляров).

Результаты: При анализе картины крови у животных экспериментальных групп не обнаружено систематических изменений, выходящих за границы физиологической нормы и значимых различий по сравнению с интактными животными.

Результаты измерения диаметра бедра животных по группам как показателя роста солидной опухоли дали следующее: спустя 7 суток после начала лечения (соответствует 14-м суткам после прививания КЭ) минимальный диаметр бедра в месте прививки опухоли был зарегистрирован у животных, получивших препарат внутривенно в свободной форме – $0,93 \pm 0,02$ см. Средний диаметр бедра животных, получивших местно (в область развития опухоли) одну цикловую дозу DOX, депонированного в полимерные микрочастицы, составил $1,16 \pm 0,05$ см. Это меньше относительно показателя у животных, получавших две цикловые дозы ($1,31 \pm 0,009$ см). Максимальные значения данного показателя были у животных в группе отрицательного контроля ($1,27 \pm 0,04$ см). Через 2 недели после получения препаратов (соответствует 17-м суткам после прививания КЭ) отмечено увеличение среднего диаметра бедра животных в положительном контроле и первой экспериментальной группе, соответственно, $1,15 \pm 0,02$ и $1,38 \pm 0,015$ см. Наиболее выраженное увеличение среднего диаметра бедра отмечено у животных во второй экспериментальной группе и в группе отрицательного контроля – $1,45 \pm 0,01$ и $1,32 \pm 0,05$ см соответственно. К концу эксперимента (соответствует 24-м суткам после прививания КЭ) значение среднего диаметра бедра животных в группе отрицательного контроля было на уровне $1,7 \pm 0,03$ см, в то время как в группе положительного оно не превысило $1,1 \pm 0,02$ см. Животные экспериментальных групп имели более высокие значения среднего диаметра бедра – $1,48 \pm 0,05$ и $1,77 \pm 0,06$ см для первой и второй групп соответственно. Увеличение размера бедра у экспериментальных животных, происходило в результате собственно развития опухоли и, возможно, из-за негативного воздействия на ткани DOX, что могло сопровождаться воспалительным процессом (известно, что исследуемый препарат вызывает некроз тканей).

Поэтому, помимо регистрации изменения среднего диаметра бедра, оценивали структуру тканей и морфологические показатели опухолевого процесса на основе гистологических исследований. Опухолевая ткань была представлена резко атипичными крупными, полиморфными опухолевыми клетками, с атипичными крупными полиморфными ядрами, выявлены также атипичные гигантские многоядерные клетки и симпласты.

Для оценки развития опухоли и лекарственной эффективности препарата регистрировали площадь опухоли и некроза на срезе опухолевых тканей. Действие свободного доксорубина (введение в/в) было сопоставимым с инкапсулированным препаратом; на первой неделе лечения площадь опухоли в среднем составила 75 % от площади опухолевой ткани на срезе. Начиная со второй недели, площадь опухоли в положительном контроле снизилась на 28 %, а в экспериментальной группе – значительно, на 46 %. Спустя еще одну неделю после начала лечения площадь опухолевой ткани в положительном контроле и в первой экспериментальной группе (1 цикловая доза) были сопоставимы и составили в среднем около 37 %, а во второй экспериментальной группе (2 цикловых дозы) ниже, на уровне 22 %.

Начиная с первой недели лечения, наблюдали подавление активности развития опухолевой ткани с формированием полей некроза, достигающих до

30 % от площади опухолевой ткани на срезе у животных экспериментальных групп. Спустя две недели лечения противоопухолевый эффект в положительной контрольной группе был выше, чем в экспериментальных группах. На третьей неделе лечения максимальное подавление развития опухоли (78 %) отмечено во второй экспериментальной группе животных, которым вводили метсно двойную цикловую дозу препарата в виде микрочастиц. Этот показатель у животных в группе положительного контроля и в первой экспериментальной группе, которым вводили одну цикловую дозу, не имел достоверных отличий.

Таким образом, результаты экспериментальной оценки противоопухолевой эффективности доксорубина, депонированного в микрочастицы из П-3-ГБ на модели животных с солидной формой КЭ показали возможность введение такой формы препарата местно в область развития опухоли. При этом его действие на развитие опухолевого процесса было сопоставимым с введением препарата в свободной форме. Важно отметить, что свободный препарат вводился еженедельно, в то время как препарат, депонированный в микрочастицы, вводился однократно.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ №220 (проект «Биотехнологии новых биоматериалов»), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 93).

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ФОРМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА

Умняшкина О.С., Шендрик М.А.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail: manyasha.06@mail.ru*

Создание систем контролируемой доставки лекарств – важнейшее направление современной биотехнологии и фармакологии. Такие системы широко применимы для лечения длительно текущих заболеваний. Использование новых форм лекарственных препаратов на основе резорбируемых полимерных носителей делает возможным долговременную и целенаправленную доставку в организм определенной дозы лекарства и его контролируемое высвобождение с течением времени, что увеличивает эффективность действия препарата. Полигидроксиалканоаты (ПГА) –перспективный материал для создания таких форм лекарственных препаратов. К числу наиболее изученных представителей этого семейства относят полигидроксибутират (ПГБ) и сополимерв ПГБ с полигидроксиивалератом (ПГБ/ГВ). Эти полимеры абсолютно безвредны для организма, обладают необходимым спектром физико-химических и медико-биологических свойств, включая биосовместимость и способность к биodeградации с образованием нетоксичных конечных продуктов.

Цель работы – конструирование полимерных носителей из полигидроксибутирата в виде пленок и микрочастиц для депонирования лекарственных препаратов (диклофенак и рифампицин) и исследование кинетики выхода препарата *in vitro*.

Материалы и методы: С использованием метода полива из раствора ПГБ получали матриксы для депонирования лекарственного препарата в виде пленок. Для модификации поверхности и повышения гидрофильности пленочных матриксов в раствор полимера добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) из расчета 20 % от массы полимерного материала. Для изучения динамики выхода препарата была получена серия полимерных пленок из ПГБ/ПЭГ (молекулярная масса ПЭГ Мв 40 и 4000 Да).

В качестве лекарства для депонирования использовали водный раствор диклофенака. Для получения депонированной формы диклофенака в виде микрочастиц формировали водно-масляную эмульсию с помощью ультразвука. Содержание препарата в матриксе составило 1,25 % от массы полимера.

Результаты: Микрочастицы были получены методом испарения растворителя из трехкомпонентной эмульсии, которая предварительно была гомогенизирована с помощью мешалок и ультразвуковой обработки. В качестве лекарства использовали рифампицин. Следует отметить, что полученные микрочастицы были гетерогенны по диаметру, от 0,5 мкм до 80 мкм. Показано, что нагружение микрочастиц антибиотиком не влияло на структуру поверхности микрочастиц. Эффективность инкапсулирования лекарственного препарата составила 60 %.

Для изучения кинетики выхода препарата были исследованы частицы с различным содержанием антибиотика (10, 20, 30% от массы полимерного носителя). На примере антибиотика из группы рифампицина показана возможность варьирования величины включения препарата в полимер и регулирования скорости оттока препарата в среду. Количество высвободившегося антибиотика через 72 ч с 30% содержанием рифампицина составило 0,04159 мг/мл; с 20 % - 0,02623 мг/мл и с 10 % антибиотика - 0,00828. Это составило 0,23 0,17 и 0,10 %, соответственно, от величины включения препарата в носитель. Спустя 168 ч наметился выход препарата на плато, и скорость выхода начала снижаться. Спустя 15 суток от начала эксперимента в среднем выход рифампицина составил: 0,087 мг/мл – 30% антибиотика; 0,061 мг/мл – 20%; 0,024 мг/мл – 10%. При этом выход препарата составил, соответственно 0,48%, 0,40% и 0,29% от включенного. Кривые выхода рифампицина имели вид, характерный для диффузионного процесса. Можно предположить, что незначительное вымывание препарата с поверхностных слоев частиц могло иметь место в первые часы наблюдения, а основная масса рифампицина высвобождалась из полимерного матрикса в результате диффузии. Скорость выхода антибиотиков из полимерных микрочастиц зависела от величины включения препаратов.

Добавление ПЭГ к полимеру во всех случаях привело к снижению контактного краевого угла смачивания водой поверхности пленок, то есть увеличило гидрофильность носителя. В первые двое суток эксперимента в модельную среду вышло около 32 % от общего объема включенного диклофенака. За 7 суток экспозиции общий выход диклофенака составил около 37 % от включенного. В дальнейшем объем выхода диклофенака, как и скорость вымывания, достоверно не изменялись. Таким образом, за 7 суток экспозиции в ФСБ из ПГБ/ПЭГ пленок вышло около 0,08 мг (ПЭГ Мв 40 кДа), 0,09 мг (ПЭГ Мв 4600 Да), 0,065 мг (ПЭГ Мв 2000 Да) препарата, при теоретическом включении – 0,21 мг.

Отсутствие резких выбросов в начальные периоды наблюдения и низкие скорости выхода препарата в среду свидетельствуют о перспективе использования пленок и микрочастиц из ПГБ в качестве пролонгированной лекарственной формы диклофенака и рифампицина.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ШОВНОГО МАТЕРИАЛА В АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

Винник Ю.С.¹, Маркелова Н.М.¹, Василеня Е.С.¹, Шишацкая Е.И.²

¹*Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Росздрава*

²*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Свободный, 79*

Цель работы – исследование пригодности шовных нитей из резорбируемого полимера 3-гидроксимасляной кислоты для наложения однорядного энтероэнтероанастомоза.

Материалы и методы: Моножильные волокна изготовлены экструзией из расплавов полимера 3-гидроксимасляной кислоты (полигидроксibuтират, П-3-ГБ), синтезированных по технологии Института биофизики СО РАН, с использованием лабораторного автономного экструдера Brabender® 19/25 D (Германия) с круглой фильерой (диаметр 1 мм) и последующим ориентированием. Физико-механические характеристики волокон определены на универсальной электромеханической разрывной машине Instron 1122 (Великобритания) при скорости растяжения 100 мм/мин. Волокна имели диаметр 0,15-0,17 мм (метрический размер 2), абсолютную прочность 300 МПа, модуль упругости 3 ГПа и высокую механическую устойчивость в условиях статического и циклического нагружения (до 100 МПа). Для стерилизации волокон использовали автоклавирование, которое не снижало показателей механической прочности изделий. Волокна использованы для наложения однорядного энтероэнтероанастомоза. Эксперименты на животных выполнены с разрешения и в соответствии с Программой исследований, утвержденной Комиссией Института биофизики СО РАН по биоэтике, Этическим Комитетом КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Возможность использования волокон из ПГБ для наложения кишечного шва исследовали на беспородных собаках обоего пола весом от 12 до 20 кг. Животные были распределены на 2 группы. В первую группу или группу сравнения было включено 15 животных, которым был выполнен энтероанастомоз «бок в бок» с помощью однорядного П-образного серозно-мышечно-подслизистого шва. В стерильных условиях под комбинированным внутривенным наркозом (калипсол+дроперидол в/м) выполняли верхнесрединную лапаротомию. В рану выводили подвздошную кишку, которую пересекали на расстоянии 40 см от илеоцекального угла. В качестве шовного материала был использован широко распространенный Vicril 3.0 с атравматичной иглой. Вторую исследуемую группу составили 9 животных, где аналогичный анастомоз был выполнен с помощью нитей из ПГБ.

Изучение общей реакции тканей на П-3-ГБ нити проводили гистологическими методами. Для этого отбирали фрагменты тканей в месте имплантирования нитей; материал фиксировали в 10-ти % формалине и заключали в парафин; из блоков готовили срезы толщиной 5-10 мкм и анализировали с использованием Image Analysis System «Carl Zeiss» (Германия).

Результаты: Все оперированные животные удовлетворительно перенесли оперативное вмешательство и анестезиологическое пособие. В раннем послеоперационном периоде с целью антибиотикопрофилактики был

применен препарат Офрамекс (цефтриаксон) в дозе 1,0 г 2 раза в сутки в течение 3-х суток, а также анальгетики, спазмолитики.

С 5-х суток питание животных соответствовало обычному рациону. На протяжении всего периода наблюдения были активны, имели хороший аппетит, содержались на стандартной диете. Ежедневно проводили взвешивание. Потери массы тела ни в одном случае не наблюдали. Швы удаляли на 14-е сутки, заживление послеоперационной раны происходило первичным натяжением. Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 100 суток.

Морфологические методы исследования тканей в зоне кишечного анастомоза включали макроскопическое описание и гистологическую характеристику препаратов. Макроскопически (по данным аутопсии) через 100 суток оценивали наличие выпота, выраженность спаечного процесса в свободной брюшной полости, внешний вид энтероэнтероанастомоза, его проходимость, наличие рубцовых изменений в зоне наложения кишечных швов.

При аутопсии все анастомозы были проходимы и состоятельны, признаков местного и распространенного перитонита не отмечено ни у одного из животных. В первой группе у всех животных в области соустья выявлен умеренный спаечный процесс, с вовлечением в процесс сальника и брыжейки тонкой кишки с наличием плотных, плоскостных спаек. У одного животного первой группы при разделении спаечного конгломерата в зоне анастомоза произошла десерозация участка тонкой кишки, непосредственно прилегающего к зоне анастомоза. У 2-х животных была отмечена умеренно выраженная рубцовая деформация в месте наложения анастомоза. Нити Викрила четко визуализировались.

У животных экспериментальной группы спаечный процесс был значительно менее выражен. Макроскопически в зоне анастомозов отмечалось незначительное утолщение кишечной стенки, рубцовой деформации в месте выполнения кишечного шва выявлено не было, нити ПГБ не визуализировались.

При анализе морфологических препаратов зоны анастомозов у животных обеих групп получены схожие результаты.

На уровне анастомоза определялась созревающая грануляционная ткань, представленная сосудами капиллярного типа, определялись фибробласты, эпителиальные, плазматические клетки, лимфоциты, эозинофилы и единичные лейкоциты. Смещения слоев стенки кишки не выявлено. Эта картина соответствовала срокам формирования анастомоза (100 дней) и может свидетельствовать о том, что процесс регенерации находился в стадии завершения. Определялись сформированные сосуды, гладкомышечные клетки, соединительная ткань, разрезы сосудов, нервные клетки и тонкий слой мезотелия.

Таким образом, результаты экспериментальных исследований нитей из ПГБ для выполнения ручного П-образного серозно-мышечно-подслизистого кишечного шва выявили отсутствие признаков перитонита и несостоятельности соустья, незначительно выраженное образование спаек в зоне вмешательства, отсутствие воспалительной реакции кишечной стенки на нить.

Это позволяет положительно оценить результаты применения нитей ПГБ для формирования кишечного шва и требует дальнейших исследований, в частности, микробной проницаемости, механической прочности и клинических испытаний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОЖГОВЫХ РАН У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ МАГНИТНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, НАГРУЖЕННЫМИ АНТИБИОТИКОМ, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Лысенко Е.В.

Сибирский Федеральный Университет, г.Красноярск, пр. свободный, 79

Применение наноматериалов в медицине и фармакологии является приоритетным направлением, позволяющим решать самые актуальные проблемы экспериментальной фармакологии. Исследование магнитных наночастиц обусловлено их уникальными физическими характеристиками и широким спектром областей применения.

Рациональное применение антибактериальной терапии в комплексном лечении ожоговых ран позволяет снизить частоту и тяжесть инфекционных осложнений ожоговой болезни, однако до сегодняшнего дня это является серьезной проблемой. Помимо непосредственной опасности для жизни, длительное наличие инфекции приводит к задержке процесса заживления ожоговых ран и способствует избыточному рубцеванию, которое продолжается в результате хронической стимуляции воспалительных клеток. Таким образом, любое по тяжести ожоговое поражение создает условия для развития раневой инфекции. При обширных и глубоких ожогах в организме возникает ряд патологических процессов, проявляющихся клинической картиной ожоговой болезни и создающих дополнительные предпосылки для развития инфекционного процесса и его генерализации. Именно поэтому постоянное совершенствование методов профилактики и лечения инфекции остается одной из приоритетных задач ожоговой терапии.

Цель исследования - изучение микробного пейзажа ожоговых ран у крыс при лечении антибактериальными препаратами на примере амоксициллина совместно с магнитными наночастицами при воздействии магнитного поля.

Объектом исследования была микрофлора, полученная из ожоговых ран 20 крыс (самки, масса тела 220-250 г), которые были разделены на 4 группы по 5 животных в каждой: 1 группа - контроль (ожог без лечения), 2 группа – ожог и лечение мазью с амоксициллином, 3 группа – ожог и лечение мазью с наночастицами, 4 группа – ожог и лечение мазью с наночастицами и амоксициллином.

Все группы животных подвергали воздействию в месте обожженного эпидермиса магнитоакустическим аппаратом МАГОФОН-01. Начиная с первого дня воздействовали по 3 мин и увеличивали воздействие ежедневно до девятих суток по 1 мин.

На 10-й день с обожженной поверхности были взяты мазки для исследования микрофлоры и ткань обожженного эпидермиса для гистологического анализа. Приведены также гистологические исследования тканей в месте повреждения.

Результаты: При исследовании количественного состава микрофлоры ожоговых ран у крыс было установлено, что на кожных покровах исследуемых крыс на 10 сутки в контрольной группе были обнаружены бактерии рода *Staphylococcus*, *Enterococcus* (*E.faecalis*) и *Enterobacteriaceae spp.* (*P.aeruginosa*) (табл.1). Присутствие этих бактерий в данном количестве может свидетельствовать о нарушении нормальной микрофлоры эпидермиса животных и развитии раневой инфекции.

При количественном анализе микрофлоры исследуемых групп крыс были получены следующие результаты. Установлено, что при лечении ожоговой поверхности мазью с амоксициллином и мазью с наночастицами количество бактерий было практически одинаковым. Тенденцию к уменьшению количества бактерий наблюдали у группы крыс, получавших для лечения мазь совместно с амоксициллином и наночастицами при воздействии магнитоакустическим аппаратом. Низкая концентрация бактерий в этой группе так же может свидетельствовать о нормализации микрофлоры эпидермиса животных.

Таблица 1 - Количественный состав микрофлоры ожоговой поверхности у крыс

Показатели	покровы	Контроль 1 сутки	Контроль 10 суток	Лечение А	Лечение А+НЧ	Лечение НЧ
	1	2	3	4	5	6
<i>Micrococcus</i> <i>sp.</i>	$5,5 \pm 2,0 \cdot 10^4$	$1,5 \pm 3,4 \cdot 10^4$	$1,5 \pm 8,8 \cdot 10^6$	$4,0 \pm 1,0 \cdot 10^4 *$	$1,0 \pm 0,4 \cdot 10^4$	$5,2 \pm 1,8 \cdot 10^{4**}$
<i>E.faecalis</i>	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^4$	-	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^6$	$3,0 \pm 2,0 \cdot 10^{4**}$	$1,0 \pm 0,5 \cdot 10^4$	$5,0 \pm 0,5 \cdot 10^4$
<i>E.coli</i>	-	-	-	$1 \pm 0,5 \cdot 10^5$	-	$1 \pm 0,5 \cdot 10^4$
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^6$	$1,2 \pm 0,34 \cdot 10^4$	$1,0 \pm 0,4 \cdot 10^4$	$2,5 \pm 0,3 \cdot 10^4$
<i>S.cohnii</i>	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^5$	-	-	-	-	-
<i>S.xylosus</i>	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^6$	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^4$	-	-	-	-
<i>S.warneri</i>	-	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^4$	-	-	-	$1,0 \pm 0,4 \cdot 10^6$
<i>S.scheiferi</i>	-	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^4$	-	-	-	-
<i>S.epidermidis</i>	$1,7 \pm 1,2 \cdot 10^5$	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^6$	-	-	-
<i>S.capitis</i>	-	-	-	-	$1,1 \pm 1,0 \cdot 10^6$	-
<i>S.intermedius</i>	-	-	$3,5 \pm 1,5 \cdot 10^6$	$2,8 \pm 2,4 \cdot 10^6$	-	$1,5 \pm 1,2 \cdot 10^7$
<i>S.aureus</i>	-	-	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^7$	-	-	-

Примечание: *- значения достоверны с вероятностью $P < 0,01$; ** - достоверны с вероятностью $P < 0,05$

По результатам гистологического анализа можно сделать следующие выводы. Эффективность лечения минимальна при воздействии чистыми наночастицами, явление при этом воспаления превалирует. При лечении с амоксициллином элементы воспаления присутствуют, но менее выражены: толщина струпа достаточна велика. Это говорит о том, что происходит еще бурная реакция воспаления, реакция экссудации, эмиграции и частично прореферации. Говорить о том, что наступает переходная стадия регенерации еще рано.

Лечебное действие антибиотика и возможное усиление его антибактериальных свойств за счет наночастиц при воздействии магнитным полем, позволяет более эффективно подавлять развитие патогенной микрофлоры, которая является одним из ключевых факторов раневого процесса, отягощающим восстановление ткани после термического воздействия. Зачастую весь антибиотик, который наносится на раневую поверхность, смывается слизью, серозным выделяемым, частично кровью, а за счет адресной доставки в ткани с помощью наночастиц при усилении их свойств магнитным полем все перечисленное происходит минимально, при этом эффективность лечения повышается, явление воспаления минимализируются, эффект регенерации превалирует.

Выводы. Успешное решение задачи при лечении ожоговых ран можно обеспечить за счет использования антибиотиков в сочетании с магнитными наночастицами при воздействии магнитоакустическим аппаратом.

Бактериологический контроль ожоговых ран показал высокую антибактериальную активность предложенного комбинированного препарата в комплексном лечении с магнитоакустическим аппаратом и восстановление микрофлоры обожженного эпидермиса животных.

АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВЫХ МАКРОФАГОВ У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМОЙ ЭРЛИХА В ПРИСУТСТВИИ ГИДРОКСИАПАТИТ-КОЛЛАГЕНОВОГО КОМПЛЕКСА

Пасечникова Ю.Ю.¹, Круглик О.В.²

*¹Сибирский федеральный университет, ²Международный научный центр исследований экстремальных состояний организма при Президиуме КНЦ СО РАН, Красноярск
Jul707@bk.ru*

Гидроксипатит-коллагеновый комплекс (ГАК), разработанный в Самарском государственном университете, используют в качестве имплантационного материала в ортопедии, стоматологии, нейрохирургии, оториноларингологии, торакальной и кардиохирургии. Возможность многопрофильного применения препарата связывают со способностью в ходе его биodeградации *in vivo* формировать микроокружение, оптимальное для репаративных процессов поврежденных тканей.

Одной из экспериментальных моделей, пригодных для исследования влияния разного рода веществ на быстро пролиферирующие ткани, является асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ). АКЭ – это недифференцированные клетки, утратившие эпителиальный характер.

Воздействие экстремальных факторов побуждают организм к проявлению защитных свойств. Одна из первых линий защиты организма – неспецифический иммунитет, в том числе тканевые макрофаги. Фагоцитарная активность макрофагов и способность продуцировать активные формы кислорода – важнейшие показатели состояния организма в экстремальных условиях. Изучение реакции органов и тканей, как нормальных, так и трансформированных, в рамках единого организма позволяет получить представление об особенностях отклика организма как сложной системы на неблагоприятное воздействие.

Цель работы - оценка фагоцитарной активности макрофагов в тканях мышей-опухоленосителей на имплантацию гидроксипатит-коллагенового комплекса (ГАК).

Материалы и методы: В эксперименте использовали белых беспородных мышей массой 20 г. Мыши из первой группы воздействиям не подвергали (контроль). Животным второй группы перевивали АКЭ. Животным третьей группы перевивали АКЭ, предварительно инкубированную в течение 40 минут при температуре 37°C с ГАК. На девятые сутки после имплантации опухоли у мышей забирали ткани (печень, селезенку, асцитную жидкость) для оценки продукции активных форм кислорода и фагоцитарной активности макрофагов в гомогенатах тканей.

Регистрацию продукции активных форм кислорода при антигенной активации *in vitro* и проводили в течение 90 мин при температуре 37°C на аппаратно-программном комплексе «Хемилюминометр CL – 3604 - ПВЭМ».

Полученные результаты: Выполненные исследования позволили сформулировать следующие выводы:

1. Присутствие гидроксиапатит-коллагенового комплекса не влияет на уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и макрофагов селезенки при развитии опухоли.

2. Изменение продукции активных форм кислорода в органах, участвующих в реакциях неспецифической резистентности организма у мышей-опухоленосителей, однонаправлены, независимо от присутствия гидроксиапатит-коллагенового комплекса.

3. Для печени введение гидроксиапатит-коллагенового комплекса может быть использовано в качестве фактора коррекции органного гомеостаза на фоне экстремального воздействия опухоли.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КОНТРОЛИРУЕМОГО
ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ ПОР МЕЗОСТРУКТУРИРОВАННОГО
СИЛИКАТА ТИПА МСМ-41 С УЧАСТИЕМ
МЕТИЛДИМЕТИЛАМИНА**
Мяснова Ж.С. , Парфенов В.А.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр.Свободный, 79,
Россия
zhanna_myasnova@rambler.ru*

Изучение фундаментальных аспектов химии мезоструктурированных материалов (МММ) и их структуры тесно связано с созданием композитных материалов для их практического применения. Особая структура поверхности, огромный внутренний объем пор, возможность модифицировать поверхность различными функциональными группами, а также высокая химическая и термическая стабильность кремниевых мезопористых частиц позволяют применять их в различных областях, включая системы доставки лекарственных препаратов. МСМ-41 является наиболее ярким представителем семейства M41S. Этот тип МММ имеет регулярную гексагональную структуру с узким распределением пор по размерам (около 35 Å) и высокими текстурными характеристиками (удельная поверхность 1000-1200 м²/г; удельный объем пор 1 см³/г). МММ обладают значительным потенциалом регулирования размеров пор через выбор поверхностно-активных веществ (ПАВ), введение в среду синтеза дополнительных агентов, а также изменением условий их получения (варьирования температуры, состава и т.п.).

Цель работы - исследование процессов контролируемого изменения размеров пор мезоструктурированного силиката типа МСМ-41 с участием метилдиметиламина на стадиях первичного осаждения (ПО) и гидротермальной обработки (ГТО).

Материалы и методы: Структурные и текстурные характеристики полученных материалов были установлены на основании рентгенографического и адсорбционного методов анализа.

Для реализации поставленной цели была проведена экспериментальная проверка подходов, описанных в литературе. При экспандировании материалов на стадии первичного осаждения в качестве экспандеров ранее были испытаны октиламин, триэтиламин, триметилбензол, метилдиметиламин.

Результаты: Лучшие результаты были достигнуты при использовании метилдиметиламина. В процессе спиртово-аммиачного синтеза эффекта

увеличения размера пор материала типа MCM-41 не наблюдали в отличие от условий синтеза без применения в составе реакционной смеси этилового спирта (аммиачный синтез). Показано, что в присутствии этанола не удастся сохранить структурный тип MCM-41.

Анализ литературных сведений показал недостаточную изученность влияния температуры стадии первичного осаждения на процессы экспандирования MCM-41. При экспандировании материалов при различных температурах синтеза (10, 25, 35°C) на стадии первичного осаждения (в аммиачных условиях) наблюдали рост «критического» параметра гексагональной фазы (образованной с участием насыщенных мицелл Дебая-Мак-Бейна). Полученные результаты позволяют оценить эффективные значения критических размеров мицелл ($d_{кр.}$) Дебая-Мак-Бейна при реализованных температурах. Оценка заключается в вычитании из $a_{кр.}$ толщины силикатной стенки – величины порядка 8 Å. Этими исследованиями установлена прямая температурная зависимость эффективного критического размера мицелл ($d_{кр.}$) Дебая-МакБейна состава STA^+/CDA . Так $d_{кр.}(10^\circ C) < 42 \text{ Å}; 49 < d_{кр.}(25^\circ C) < 52 \text{ Å}$ и $52 < d_{кр.}(35^\circ C) < 55 \text{ Å}$.

В литературе сообщается об успешном получении материала типа MCM-41 с параметром элементарной 71,1 Å. Этот показатель превышает достижимые для MCM-41 значения на 50 %. В настоящее время это значение признано предельными для MCM-41. В результате выполненных экспериментов (в рамках применения экспандера на стадии первичного осаждения) нам удалось вплотную приблизиться к предельному значению параметра, при котором материал имеет информативную рентгенограмму. Экспериментально полученное значение параметра составило 64 Å.

Вторая часть работы была реализована в динамических ($t_{ГТО}$ от 100 до 150°C, $\tau_{ГТО}$ 2, 4 и 6 ч. при каждой из температур) и статических ($t_{ГТО}$ 120°C, $\tau_{ГТО}$ 24, 48 и 72 ч.) условиях. Было выявлено, что для процесса экспандирования статические условия являются более выгодными для формирования высокоструктурированных продуктов с высокими значениями параметров решетки при условии получения информативных рентгенограмм. Подбор условий стадии ГТО позволяет более точно контролировать размер пор через варьирование температуры и продолжительности стадии ГТО. Превышение реперного значения параметра (64,1 Å) $\approx$ на 10 Å позволяет считать условия $t_{ГТО}$ 120°C, $\tau_{ГТО}$ 48 ч. наиболее выгодными, а сам подход - целесообразным. Комплексное применение 2-х стадий (п.о. и ГТО) является перспективным, так как позволяет увеличить параметр решетки на 60 % при условии получения фазовочистых высокоорганизованных материалов типа MCM-41.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

РАЗДЕЛ 2

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ Е-ИНСТРУМЕНТАРИЯ В БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Суковатый А. Г., Комаров В. А., Суковатая И. Е., Худоногов Д. Ю.

ФГАОУ Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79

Сегодня практически все области научной деятельности сталкиваются с быстро растущими проблемами: как организовать, использовать и сделать понятным огромное количество экспериментальных данных, которые генерируются в т. ч. благодаря современной организации научного процесса с применением информационных компьютерных технологий *e-Science*, а также позволяет работать с уникальным экспериментальным оборудованием в режиме *remote sensing* (удаленного зондирования).

Активное использование *e-Science* позволяет исследователю кардинально изменять методику проведения физических экспериментов, используя электронный е-инструментарий (*e-tools*): приборную базу, интегрированную с информационными и компьютерными измерительными технологиями и обеспечивающую одновременно территориальное распределение рабочих групп. К измерительным ПЭВМ в этом случае могут быть подключены как уникальные лабораторные установки и приборы, которые управляются непосредственно через ПЭВМ, так и специализированные аппаратно-программные комплексы, созданные на основе компьютерных измерительных технологий с применением унифицированных аппаратно-программных решений (например, решений корпорации *National Instruments* [<http://www.ni.com>]). В этой связи очень важно научиться этому инструментарию для уверенного вхождения в профессиональное научное сообщество.

Приобретение практических навыков работы с современным лабораторным оборудованием, знакомство с современными методами и средствами автоматизации научных и учебных экспериментальных исследований осуществляется на основе разработанных уникальных аппаратно-программных комплексов как с удаленным доступом, например, «Электропроводность биологических объектов», так и функционирующих в локальном режиме, например, АПК «Аудиометр», так и с помощью внедрения в образовательной и процесс программ-тренажеров (рис.1), которые помогают как научить студентов (бакалавров/магистров) работать на сложных экспериментальных приборах, так и проверить степень готовности работать на современном экспериментальном оборудовании.

Дистанционное управление автоматизированным лабораторным макетом и выполнение лабораторных исследований осуществляется посредством взаимодействия пользователя с виртуальным лабораторным стендом (рис. 2). Функциональные возможности автоматизированного лабораторного макета (АЛМ) «Электропроводность биологических объектов» и комплекса специализированного программного обеспечения позволяют исследовать зависимости электропроводности (активной и реактивной составляющей сопротивления) от частоты образцов биологических объектов, имеющих различную степень термообработки в режиме многопользовательского удаленного доступа по сетям Интернет/Инtranет. Подключение к автоматизированному лабораторному макету осуществляется в режиме многопользовательского удаленного доступа по сетям Интернет/Инtranет.

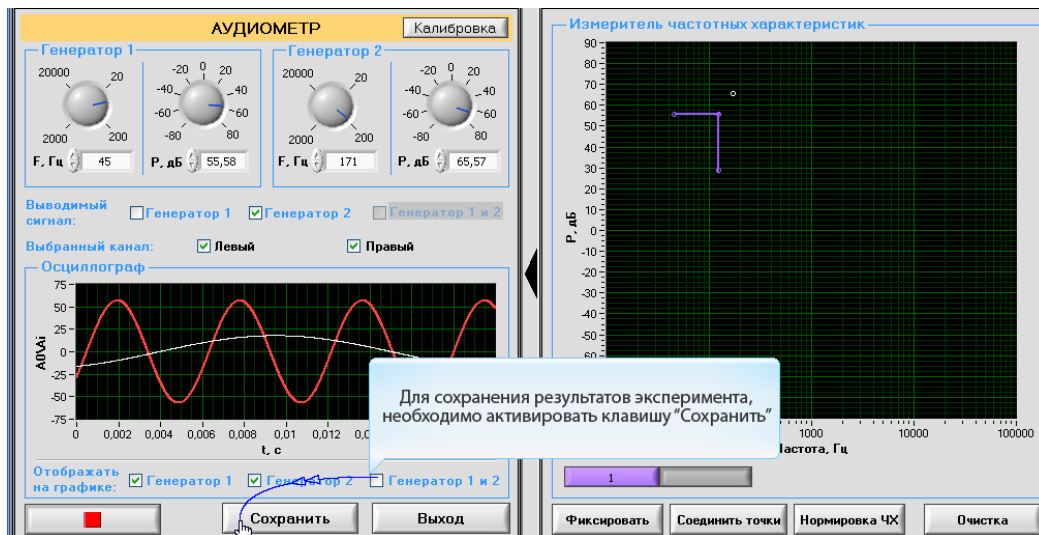


Рис. 1. Пример работы тренажера

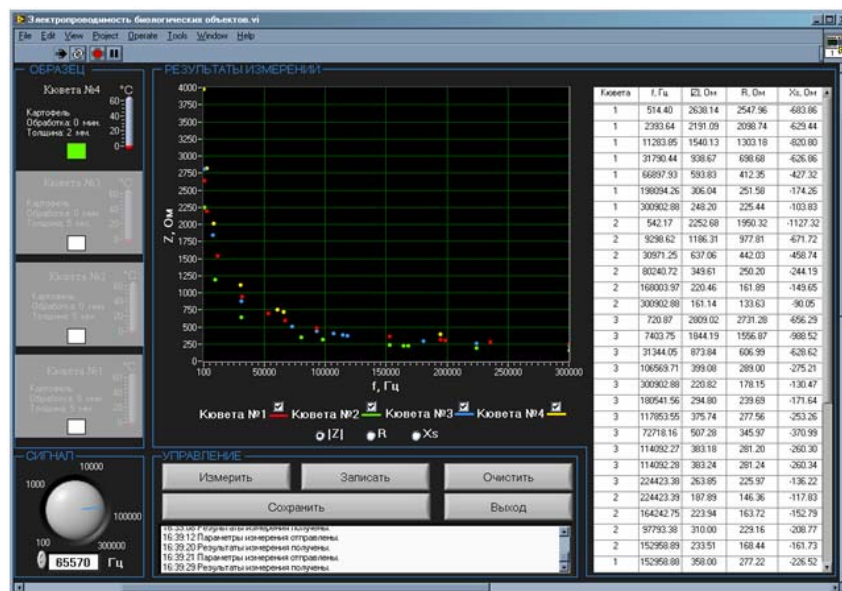


Рис. 2. Виртуальный лабораторный стенд АПК УД «Электропроводность биологических объектов»

Помимо описанного выше АЛМ «Электропроводность биологических объектов», авторской группой был разработан АЛМ «Аудиометр» [i], который позволяет выполнять измерения:

- зависимостей наименьшей интенсивности звука, которая воспринимается человеческим ухом от частоты для моноурального и биурального слуха (определение порогов слышимости);
- зависимости интенсивности звука соответствующей определенному уровню громкости от частоты (измерение кривых равной громкости);
- чувствительности слуховой системы к минимальному изменению силы звука (определение разностных порогов громкости);
- чувствительности слуховой системы к минимальному изменению частоты звука (определение разностных порогов частоты).

3. Внешний вид панели управления АЛМ «аудиометр» представлен на рис.

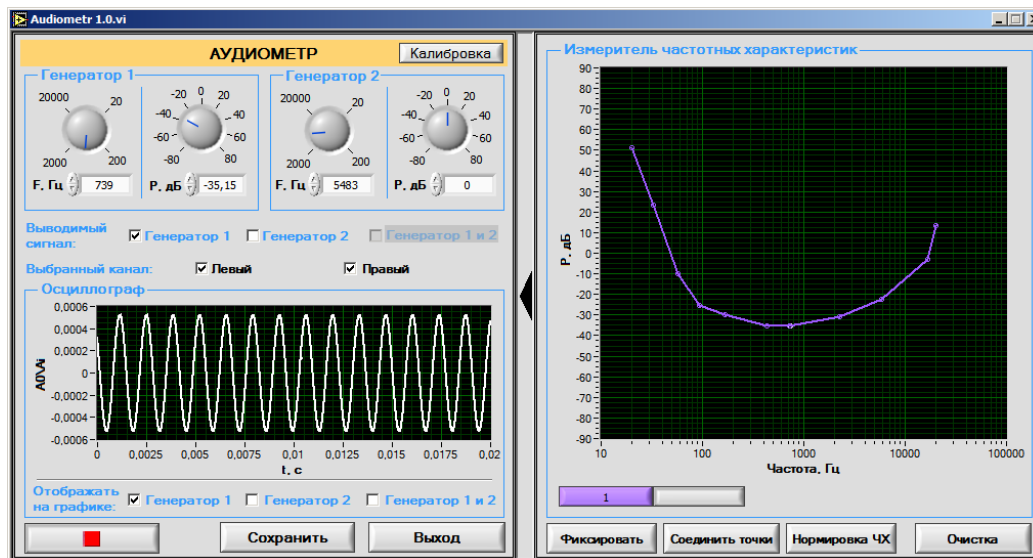


Рис 3. Лицевая панель виртуального лабораторного стенда «Аудиометр» в режиме измерения частотных характеристик

Таким образом, использование подобного инструментария в рамках обучения может стать *первым* шагом в использовании бакалаврами и магистрами е-инструментария в рамках их научно-исследовательских работ, в том числе практик; позволяет решать целый ряд задач, связанных с внедрением современных ИКТ в научно-исследовательскую и образовательную деятельность в области биологии и биофизики. Освоение Интернет-технологий позволит сформировать у магистров не только новый уровень профессиональной компетентности, но и повысит их конкурентоспособность на рынке труда и даст им возможность вести активную научную и инновационную деятельность.

Работа выполнена при поддержке гранта № 2.2.2.2/5309 Министерства образования и науки РФ, Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы», проект «Моделирование процессов функционирования сопряженных ферментативных систем в клетке на примере ферментов светящихся бактерий», 2009-2011; грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы», проект «Биолюминесцентный анализ молекулярных процессов в клетках и их физико-химических моделях; создание на их основе нового поколения биолюминесцентных сенсоров для биологии и медицины», контракт № 02.740.11.0766.

Литература:

1. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2010613017. Управление учебно-исследовательским аппаратно-программным комплексом аудиометрии на базе персонального компьютера / М. Л. Дектерев, В. А. Комаров, А. В. Сарафанов, И. Е. Суковатая, А. Г. Суковатый, Д. Ю. Худоногов. – М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам (РОСПАТЕНТ), 2010.

ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И КАЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

Калачева Г.С.

¹Институт биофизики СО РАН, Россия, Красноярск, 3600036,
Академгородок, д. 50, строение 50; ²Сибирский Федеральный университет
e-mail: kalach@ibp.ru

Одной из бурно развивающихся отраслей биотехнологии является технология микробного синтеза ценных для человека веществ. Доминирующую долю продуктов, созданных на основе современных биотехнологий, составляют фармацевтические белки, возобновляемые источники энергии, аминокислоты, витамины и другие важные соединения, используемые в различных сферах человеческой деятельности. Микроорганизмы являются источником получения разнообразных высокомолекулярных соединений (на основе полисахаридов, полигидроксиалканоатов-ПГА, и др.). Область использования последних широка, – от сельского хозяйства до медицины.

Важным аналитическим методом, используемым в современной биотехнологии, считается газо-жидкостная хроматография. На газохроматографических капиллярных колонках в одном эксперименте могут быть разделены более 1000 индивидуальных компонентов. Использование в хроматографических системах масс-спектрометрических детекторов позволяет получать больше информации об объекте исследования.

Масс-спектрометры в сочетании с газовым хроматографом - одни из наиболее распространенных современных аналитических приборов, обеспечивающих предварительное разделение вещества и позволяющие иметь дело не со смесью соединений, а с индивидуальными соединениями. Существуют "библиотеки" масс-спектров, содержащие спектры более 650000 органических соединений, по которым можно проводить их идентификацию с применением специальных компьютерных программ.

Приводим пример, как с помощью масс-спектрометрии были идентифицированы углеводороды двух представителей *Botryococcus* – музейного штамма и изолята озера Шира. На рис.1 представлены масс-спектры основных углеводородов, выделенных из природного штамма *Botryococcus braunii*. На данных спектрах четко видны молекулярные ионы, характерные для доминирующих диенового и триеного углеводородов $C_{29:2}$ и $C_{29:3}$, а фрагментация молекул соответствовала углеводородным цепям с двумя и тремя ненасыщенными связями.

Методом хромато-масс-спектрометрии исследован состав жирных кислот липидов штамма-продуцента полигидроксиалканоатов *Wautersia eutropha*. Идентифицировано 27 жирных кислот и показано их распределение по клеточным фракциям. Основными кислотами цитоплазматической мембраны были пальмитиновая, пальмитолеиновая и цис-вакценовая кислоты (масс-спектры сульфидных производных моноеновых кислот приведены на рис.2). Во фракции прочносвязанных липидов преобладали длинноцепочечные β -гидроксикислоты и миристиновая кислота – компоненты липополисахаридов клеточной стенки. В условиях активного синтеза полимера в легко

экстрагируемых липидах повышалось содержанием циклопропановых и снижалась доля соответствующих моноеновых кислот. Прочносвязанные липиды характеризовались высоким содержанием длинноцепочечных β -гидроксикислот (более 50 % от суммы жирных кислот). Эти знания позволяют оценить источник загрязнения ПГА и, соответственно, выбрать стратегию его очистки.

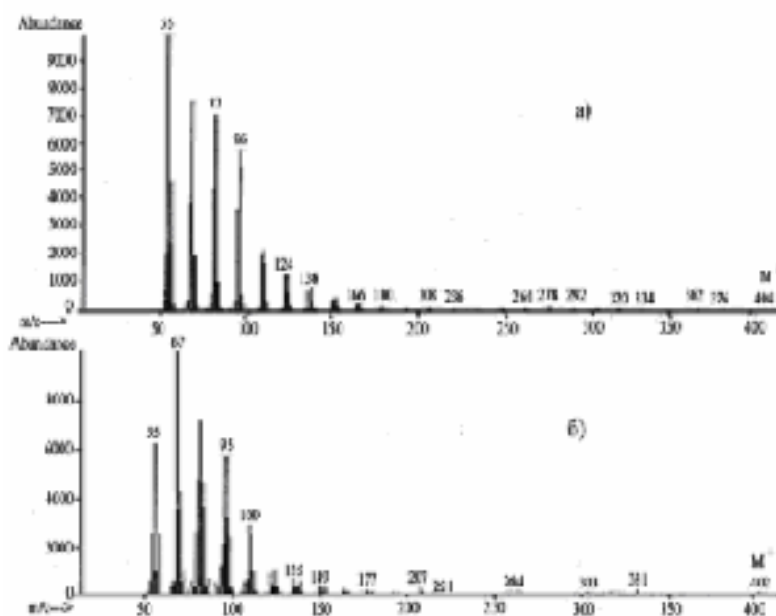


Рис. 1. Масс-спектры основных диеновых и триеновых углеводородов изолята *Botrysococcus* озера Шира: а) 29:2; б) 29:3. (Работа выполнена на хромато-масс спектрометр Agilent 5975Inert (Agilent, США))

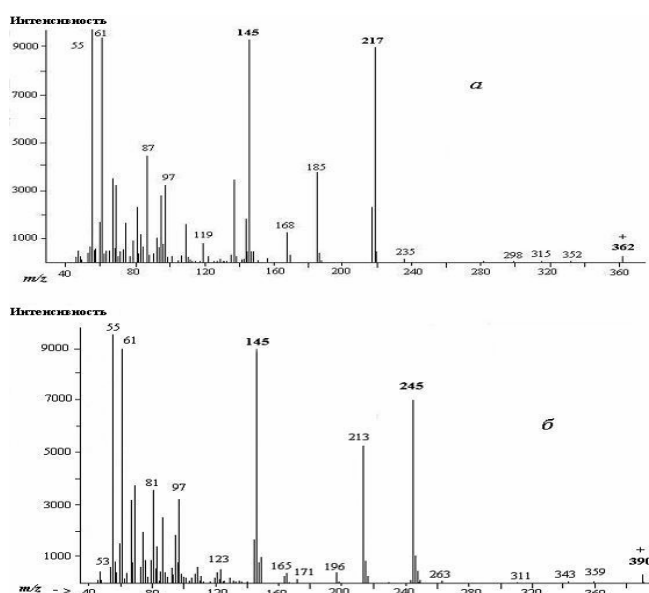


Рис. 2. Масс-спектры ДМДС производных метиловых эфиров пальмитолеиновой (а) и цис-вакценовой (б) кислот. (Работа выполнена на хромато-масс спектрометр Agilent 5975Inert (Agilent, США))

Масс-спектрометрическим методом изучен состав полигидроксиалканоатов, синтезируемых бактериями *W. eutropha*. На рис. 3

приведены две ионные хроматограммы 4-ех и 5-ти компонентных полимеров и масс-спектры соответствующих мономеров, из которых состоят полимеры. Масс-спектры β -гидроксикислот характеризуются наличием базового иона 103 m/z . Следовательно, все отмеченные на хроматограмме пики относятся к β -гидроксикислотам, а их длина определена по их временам удерживания.

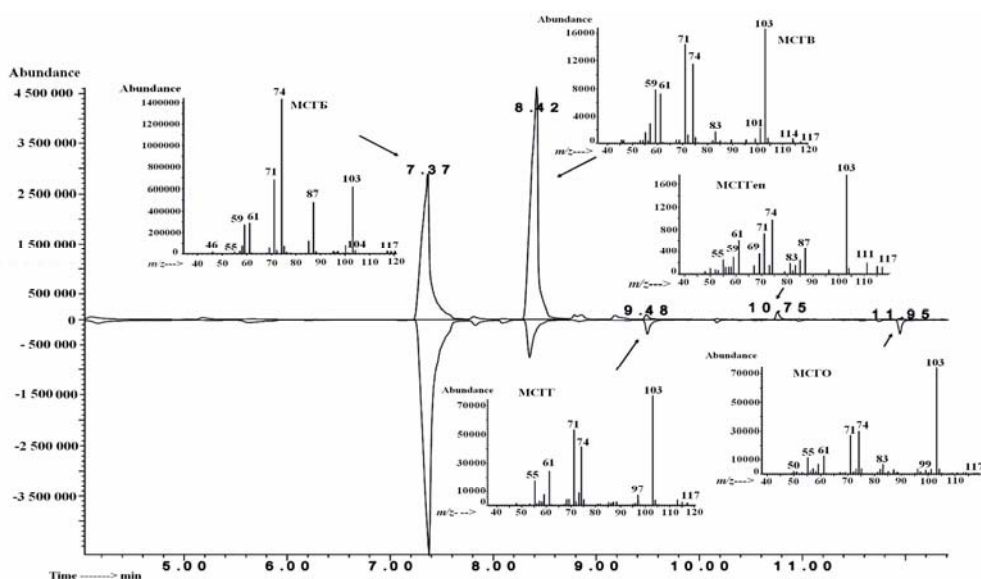


Рис. 3. Ионные хроматограммы полимеров, выделенных из биомассы *W. eutropha* B5786 с добавкой гептаноата (верх) и добавкой октаноата (зеркально внизу) и масс-спектры мономеров – ГБ – β -гидроксibuтират с временем удерживания 7.37; ГВ – β -гидроксивалерат – 8.42; ГГ – β -гидроксигексаноат – 9.48; ГГеп – β -гидроксигептаноат – 10.75; ГО – β -гидроксиоктаноат – 11.95

Таким образом, имеющая в Сибирском федеральном университете аналитическая приборная база позволяет решать различные биотехнологические задачи и идентифицировать макромолекулы различной структуры.

ПРОДУКЦИЯ НЕЗАМЕНИМЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА БИОХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ Суцик Н.Н.

Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия
Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск,
660041, Россия
nadezdas@inbox.ru

В последние десятилетия доказано важнейшее физиолого-биохимическое значение для высших животных и человека, полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 (ПНЖК), а именно эйкозапентаеновой (20:5 ω 3, ЭПК) и докозагексаеновой (22:6 ω 3, ДГК) кислот. От содержания незаменимых ПНЖК в тканях зависит эмбриональное развитие и функционирование нервной системы, органов зрения и сердечнососудистой

системы. Именно недостаток ПНЖК является основной причиной сердечнососудистых заболеваний человека. Вместе с тем животные не имеют десатураз, способных вставлять двойную связь в молекулу жирной кислоты в положение $\omega 3$. Исходную кислоту этого семейства с 18 атомами (альфа-линоленовую, 18:3 $\omega 3$, АЛК) синтезируют лишь растения. В принципе, животные могут синтезировать ЭПК и ДГК из АЛК, полученной с пищей, но все экспериментально исследованные животные, включая дафнию и человека, оказались способными за счёт собственного синтеза удовлетворить не более 5% физиологических потребностей в ЭПК и ДГК. Из всех организмов Биосферы эффективно синтезировать большие количества ЭПК и ДГК способны лишь некоторые виды микроводорослей. Поэтому именно водные экосистемы занимают в Биосфере уникальную позицию как основной источник незаменимых ПНЖК, в том числе и для человека. От микроводорослей передача ПНЖК осуществляется по трофическим цепям к планктонным и бентосным ракообразным, а затем - к рыбам и человеку. В лекции рассматриваются вопросы синтеза и передачи ПНЖК основными звеньями трофических цепей пресноводных экосистем, экспорт и значение ПНЖК, продуцированных в водных экосистемах, для наземных консументов, включая человека.

ВЛИЯНИЕ ТРИТИЯ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ТЕСТОВЫЕ СИСТЕМЫ

Архипова В.В.¹, Кудряшева Н.С.²

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН,
Красноярск, Россия
e-mail: pinareva@bk.ru

Цель работы - изучение влияния β -излучения трития на биолюминесцентные (БЛ) тестовые системы различной сложности.

Материалы и методы: В качестве объекта исследования были выбраны три БЛ-системы: интактные (живые) бактерии *P.phosphoreum* из коллекции морских светящихся бактерий Института биофизики СО РАН; препарат Микробиотест 677 F, изготовленный на основе лиофилизированных светящихся бактерий *P.phosphoreum* 1883 IBSO; ферментативная система сопряженных реакций: NADN-FMN-оксидоредуктаза – люцифераза. Источник β -излучения: тритиевая вода (НТО) различных активностей. Интенсивности БЛ-ии регистрировали на биолюминометре TriStarLB941 (Berthold Technologies, Germany).

Для конструирования ферментативной системы использовали растворы: FMN ($5 \cdot 10^{-4}$ М), тетрадеканаль (0,0025%), NADH ($4 \cdot 10^{-4}$ М), натрий-фосфатного буфера (0,05 М). В качестве контроля использовали буферный раствор без радионуклида. Для оценки влияния НТО на лиофилизированные бактерии использовали следующую реакционную смесь: 3 мкл препарата бактерий в 1,5% растворе NaCl и 150 мкл НТО различной активности. В качестве контроля использовали физиологический раствор 1,5%-го NaCl без радионуклида. Для оценки влияния НТО на интактные бактерии использовали 100 мкл суспензии бактерий, выращенных при различных активностях трития.

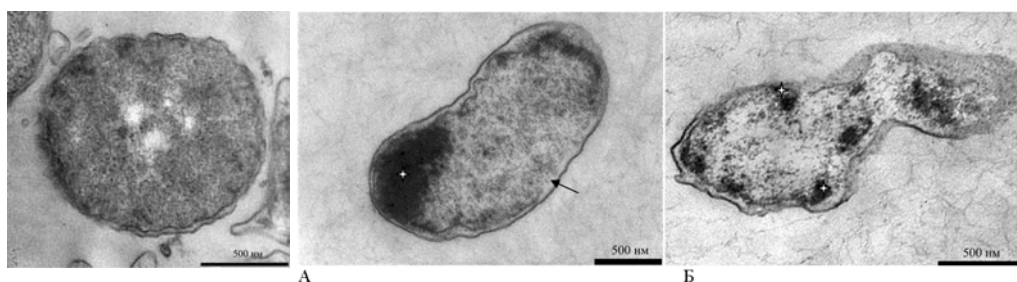
Для микроскопических исследований готовили бактериальные суспензии в присутствии радионуклида и инкубировали их при температуре $5^{\circ} \pm 10^{\circ}\text{C}$. Пробы (не менее 1 мл) отбирали на стационарной фазе роста. Для анализа

ультраструктуры подготовленные пробы центрифугировали, осадок заключали в 1 %-ный агар, фиксировали в 2,5 %-ном глutarовом альдегиде на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2); постфиксировали в 1% OsO₄ на том же буфере, окрашивали 3%-ным уранил-ацетатом в 30%-ном спирте, дегидратировали в возрастающей серии спиртов и ацетоне, заключали в смесь эпоксидных смол Epon-AralditeM (Serva, Germany).

Полимеризация протекала 12 ч при 48 °С и 48 ч при 60 °С. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Reichert–Um 03, контрастировали их 0,05% водным раствором изоцитрата свинца. Просмотр срезов осуществляли в трансмиссионном электронном микроскопе CM 100 (Philips, Netherlands) при ускоряющем напряжении 80 kV. Регистрация изображений осуществлялась с помощью 1k pixel фотокамеры Veleta (Olympus soft imaging solutions GmbH, Münster, Germany).

Для оценки комбинированного влияния НТО и гуминовых веществ на свечение лиофилизированных бактерий использовали следующую реакционную смесь: 3 мкл препарата бактерий в 1,5% растворе NaCl, 10 мкл гуматов концентрации 0,03 г/л и 150 мкл НТО различной активности. В качестве контроля использовали физиологический раствор 1,5%-го NaCl без радионуклида. Гуминовые вещества представлял препарат Гумат-80 (ООО «Гумат», Иркутск).

Результаты: Продемонстрированы изменения в микроструктуре клеток (рис. 1) и кинетике свечения БЛ систем (рис. 2-3) под действием НТО.



Контрольный образец

Рисунок 1 – Клетки *P.phosphoreum* под воздействием трития

Микроскопические данные демонстрируют поврежденность клеток под влиянием НТО. Бактериальные клетки контрольного образца (рис.1) имеют слегка волнистый профиль клеточной стенки и цитомембраны, равномерно распределенные по клетке рибосомы, в центре - менее электронно-плотная по сравнению с цитоплазмой зона нуклеоида. Под действием НТО (рис. 1 А, Б) клетки приобретают бациллярную форму (рис. 1 А), часто с признаками лизиса (рис. 1 Б). Цитоплазматическая мембрана разорвана, могут быть разрывы и в клеточной стенке (стрелка на рис. 1 А). Нуклеоид располагается у полюсов клетки (звездочка на рис. 1 А), в ряде клеток распадается на отдельные электронноплотные участки, локализованные по периферии клетки (звездочки на рис. 1 Б). У клеток с признаками лизиса просветленная цитоплазма, что свидетельствует о распаде ее содержимого.

На рис. 2 приведена кинетика БЛ-ии ферментативной системы контрольного образца и в качестве примера - кинетика двух образцов с активностями трития, одна из которых активизирует (2 МБк/л), а другая ингибирует (50 МБк/л) БЛ-ию. Полученные кривые характерны и при других активностях тритиевой воды: 200; 100; 50; 20; 10 МБк/л – ингибирование свечения, 0,2; 0,02; 0,002; 0,0002 – активация свечения МБк/л.

На рис. 3 приведена кинетика свечения лиофилизированных бактерий в растворе с радиоактивностью 2 Мбк/л. Все образцы разной радиоактивности вели себя одинаково: до 27 ч наблюдали активацию БЛ-ии, затем – ингибирование. Воздействие НТО на intactные бактерии было идентичным эффектам на лиофилизированных образцах. На основе сравнения кинетики свечения биолюминесцентных систем в присутствии тритиевой воды показано, что усложнение системы от ферментов к клеткам приводит к увеличению устойчивости к деструктивному влиянию трития.

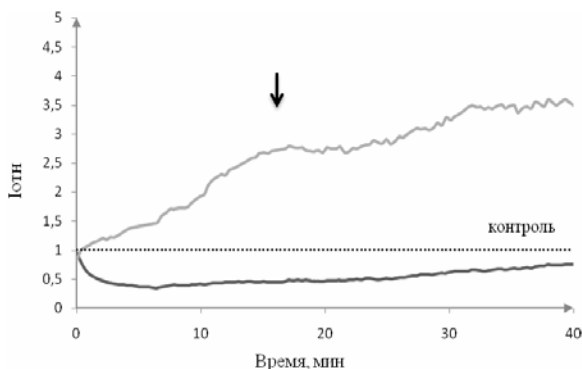


Рис. 2

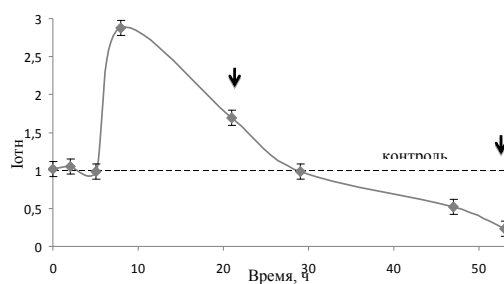


Рис. 3

Рисунок 2 - Зависимость относительной интенсивности свечения ферментативной системы от времени в НТО ($A=2$ Мбк/л) и НТО ($A=50$ Мбк/л)

Рисунок 3 - Зависимость относительной интенсивности свечения лиофилизированных бактерий от времени в НТО ($A=2$ Мбк/л)

Рис. 4 демонстрирует способность гуминовых веществ снижать эффект тритиевой воды на интенсивность БЛ-ии лиофилизированных бактерий.

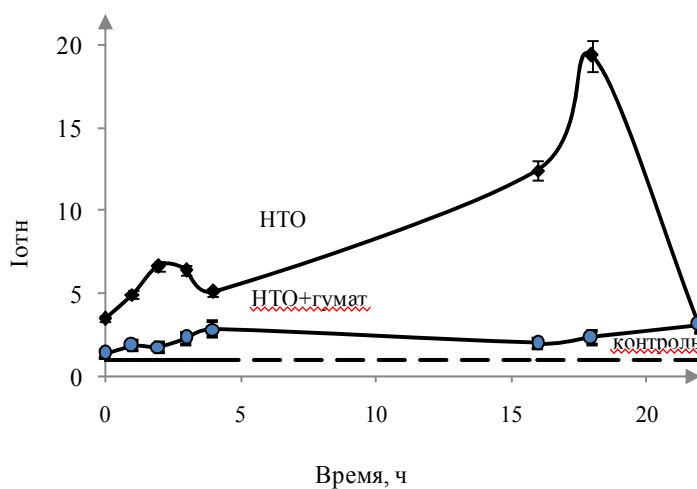


Рисунок 4 – Зависимость относительной интенсивности свечения бактерий в присутствии и отсутствии ГВ при активности НТО 100 Мбк/л

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАЛЬНЫХ И МОДЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ ПО ИХ ИНФОРМАЦИОННОЙ ЕМКОСТИ

Коваль А.А.¹, Садовский М.Г.²

¹Сибирский федеральный университет, РФ, г.Красноярск, пр. Свободный, 79

²Институт вычислительного моделирования СО РАН, РФ, Красноярск, Академгородок, 50

e-mail: anya.a.koval@gmail.com

Цель работы - обнаружение особенностей реальных нуклеотидных последовательностей на фоне модельных. В качестве критерия оценки используется показатель информационной емкости. Он характеризует частотный словарь соответствующей толщины и определяется как условная энтропия реального частотного словаря, вычисленная относительно восстановленного частотного словаря, который является аналогом равновесного распределения. Таким образом, чем больше разница между реальным распределением частот олигонуклеотидов и равновесным, тем больше информационная емкость исследуемой последовательности.

Результаты: В работе исследовали полностью секвенированные геномы вирусов, бактерий и эукариот, взятые из банка данных EMBL Европейского Института Биоинформатики. Процент неизвестных нуклеотидов в изучаемых последовательностях составил $0 \leq n \leq 10^{-5}$. В настоящее время банк генетических данных содержит 138 расшифрованных геномов эукариот. Поэтому в базу данных были включены все последовательности, процент неизвестных нуклеотидов в которых не превышал указанную выше рамку. Таким образом, было изучено 36 эукариотических геномов принадлежащих различным таксономическим группам. База вирусных геномов строилась тем же образом, и было исследовано 2139 вирусных геномов. При составлении бактериальной базы данных из неё была исключена часть геномов, принадлежащих различным штаммам, для того, чтобы избежать искажения результатов при статистическом анализе. Всего в базу было включено 733 бактериальных генома.

Поведение показателя информационной емкости изучали для реальных и модельных геномов. В простейшем случае модельные последовательности создавались как случайные нескоррелированные последовательности той же длины и с тем же моонуклеотидным составом. Кроме того в рамках настоящей работы исследовались две следующие модели: модель среднего поля и максимальный генетический код с двумя вариантами выбора кодонов. Для этого в реальных последовательностях выделялись участки, соответствующие последовательности аминокислот в дальнейшем кодирующей белок (так называемые coding sequences или CDS). В таких участках синонимичные кодоны заменялись с различной частотой так, что первичный транскрипт оставался неизменным.

В модели среднего поля генетический код считается вырожденным и равномерным, в кодировке первичного транскрипта участвуют все 64 триплета, и от реальных последовательностей модельные отличаются лишь частотами триплетов в синонимичной группе: в отличие от реальных последовательностей они там считаются равными (внутри группы). В другой исследуемой модели код считается по-прежнему равномерным, однако кодовая таблица не является вырожденной и, соответственно, в кодировании аминокислот участвуют не все 64 триплета, а лишь 21 из них. Исследовали два предельных варианта: использовался либо самый часто встречающийся триплет из синонимичной группы оригинального кодона, либо самый редко встречающийся.

Показано, что распределение частот олигонуклеотидов в реальных нуклеотидных последовательностях далеко от случайного, но при этом оно не является полностью упорядоченным, в чем заключается важное свойство существующих ныне организмов – их помехоустойчивость.

АНАЛИЗ ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ СВЯЗИ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ ГЕНОМА И ТАКСОНОМИЕЙ ЕГО НОСИТЕЛЯ

Зайцева Н.А.

*Сибирский федеральный университет
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, Россия
e-mail: zaiceva-5@g--service.ru*

Цель работы - выявление связи между структурой генома и таксономией его носителя. Под структурой в рамках настоящей работы будут пониматься частоты триплетов, наблюдаемые в последовательности. Частота это отношение числа копий n_{ω} данного триплета ко всем триплетам, наблюдаемым в последовательности:

$$f_{\omega} = \frac{n_{\omega}}{N}.$$

Материалы и методы: Исследования проводили на генетическом материале митохондрий различных организмов, который был взят из EMBL-банка (www.ebi.ac.uk/genoms/organelle.html), общее число геномов, депонированных в банке, превышает 2000. Каждый геном был представлен в виде точки в 32-мерном подпространстве частот. Для построения распределения геномов использована программа ViDaExpert (<http://bioinfo-out.curie.fr/projects/vidaexpert/>). В данной работе исследовали два подпространства:

- 32-мерное подпространство частот, включающее в себя те триплеты, которые являются «левыми» в комплиментарных палиндромических парах;
- 32-мерное пространство частот, включающее в себя те триплеты, которые являются «правыми» в комплиментарных палиндромических парах

Комплиментарные палиндромы: такие пары слов, которые читаются одинаково в противоположных направлениях с учётом замены нуклеотидов по правилу Чаргаффа.

Результаты и обсуждение: Главным способом для изучения триплетов, обеспечивающих полученное распределение, является анализ главных компонент в 32-мерных подпространствах частот триплетов «правых» и «левых» половин. Исследование проводили именно в этих подпространствах для того, чтобы исключить эффект от дублирующего вклада триплетов, составляющих комплиментарный палиндром.

Следует отметить, что каждый из 32 триплетов вносит вклад в каждую из 3 компонент. Однако с точки зрения выявления триплетов, играющих ключевую роль в полученном распределении, нас интересуют только те триплеты, которые дают наибольший вклад. Для выявления этих триплетов необходимо задать некоторый критерий, который определит величину интересующего вклада. Соответственно, триплеты, у которых величина вклада будет меньше заданной, будут отброшены.

Полученные результаты приведены в таблицах 1 и 2. После сортировки триплетов в порядке убывания их вклада (триплеты с положительным и отрицательным вкладом сортируются отдельно) было замечено, что они расположились весьма не случайно не только с точки зрения их вклада. Начиная с триплета, обладающего самым большим вкладом, триплеты по порядку образуют непрерывную последовательность до некоторого момента. Таким образом, были отобраны триплеты образующие непрерывную последовательность в порядке убывания их вкладов.

Таблица 1

Структура кластеров, выделяемых «в левых половинах» пар триплетов. Указаны три главные компоненты, приведены вклады различных триплетов в эти компоненты;

σ — стандартное отклонение для соответствующей компоненты.

1 компонента		2 компонента		3 компонента	
$\sigma = 0.5228$		$\sigma = 0.191453$		$\sigma = 0.097729$	
AGC	-0.232211	ACA	0.297725	AAG	0.361546
GCC	-0.226447	AAC	0.319105	GAA	0.432367
CAG	-0.224612	CAA	0.327225	AGA	0.446484
GCA	-0.222785	TCA	0.342829		
ATA	0.229974	ATC	0.352773		
AAT	0.237194	AAG	-0.208990		
TAA	0.238707	AGG	-0.162800		

Последовательность обрывалась, когда встречался триплет, который не может её продолжить. Соответственно, все остальные триплеты были отброшены. Следует отметить, что триплеты с положительным и отрицательным вкладом образуют разные последовательности. Тот факт, что для большинства компонент количество оставленных триплетов равно 7, не является критерием отбора и в какой-то степени является случайным. Тем не менее, он отражает характерный размер последовательности (5 – 6 символов).

Таблица 2

Структура кластеров, выделяемых «в правых половинах» пар триплетов. Указаны три главные компоненты, приведены вклады различных триплетов в эти компоненты;

σ — стандартное отклонение для соответствующей компоненты.

1 компонента		2 компонента		3 компонента	
$\sigma = 0.495338$		$\sigma = 0.225856$		$\sigma = 0.074879$	
TAT	-0.216947	CAT	-0.287077	TTC	-0.270384
ATT	-0.215568	TAC	-0.242581	CTT	-0.262823
TTA	-0.200647	TCC	-0.189710	TCT	-0.241349
TGC	0.231202	CCT	-0.152922	CCT	-0.153672
CGG	0.231317	TGT	0.289945	TCC	-0.141972
GGC	0.237066	GTT	0.325616	AGT	0.424223
CTG	0.239307	TTG	0.340654	TAG	0.493010

Полученные результаты свидетельствуют о том, что распределение геномов, которое и отражает особенности их структуры, связанные с

таксономией носителя, обусловлены не отдельными триплетами, а небольшими последовательностями. Более подробное изучение полученных последовательностей является предметом будущих исследований.

ИНФЕКЦИИ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ – МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Коростелева Н.С.¹, Аверьянов А.Б.², Новикова Т.В.², Пашкова Д.Н.²

*Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно – Ясенецкого¹
e-mail: Natali.Korosteleva@gmail.com*

Инфекционные заболевания кожи и мягких тканей (ИКМТ) попрежнему остаются актуальной проблемой медицины. В структуре хирургической заболеваемости и летальности они занимают одно из ведущих мест. Клинически важной особенностью таких инфекций является быстрое развитие генерализованной реакции макроорганизма в ответ на инфекционный процесс. Значимость данной проблемы обуславливается тем фактом, что доля заболеваний, связанных с хирургической инфекцией кожи и мягких тканей, в структуре первичной обращаемости к общему хирургу достигает 70 %. О важности этой патологии свидетельствует и тот факт, что летальность при таких заболеваниях, как некротические инфекции, может достигать 50 и более процентов. По оценкам экспертов, ежегодно в РФ данная патология встречается у 700 тыс. пациентов.

С этиологической точки зрения ИКМТ являются обычно бактериальными и во многих случаях - полимикробными. Бактерии, которые чаще всего участвуют в процессе, – это *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, энтеробактерии и анаэробные микроорганизмы (*Bacteroides* группы *fragilis* и *Clostridium spp.*). *S. aureus* является наиболее распространенным в большинстве случаев инфекций кожи и мягких тканей. Эффективность лечения стафилококковых инфекций снижается вследствие широкого распространения в стационарах штаммов, устойчивых не только к оксациллину/метициллину (MRSA), но и к бета-лактамам антибиотикам, а также к другим классам антибактериальных препаратов, в частности к аминогликозидам, макролидам, линкозамидам, фторхинолонам. Инфекции, вызванные MRSA, имеют большое медицинское и социальное значение, так как сопровождаются более высокой летальностью и требуют больших материальных затрат на лечение [2]. В стационарах РФ частота метициллинрезистентных возбудителей инфекций (MRSA) в последние годы постоянно увеличивается и в среднем составляет 65 %, хотя отмечаются существенные различия в величине этого показателя между отдельными учреждениями (от 5 до 90 %).

Очевидно, что учащение и увеличение тяжести течения воспалительных заболеваний привели к значительному росту временной нетрудоспособности. Таким образом, рассматриваемая проблема имеет не только медицинское, но и важное социальное значение.

Цель исследования - изучение микрофлоры гнойных ран больных с инфекциями кожи и мягких тканей и её антибиотикорезистентности.

Задачи исследований:

1. Изучение количественного и качественного состава микрофлоры гнойных ран больных с инфекциями кожи и мягких тканей в динамике заболевания.

2. Изучение антибиотикорезистентности основных возбудителей, выделенных от обследуемых с инфекциями кожи и мягких тканей.

Методы исследования. Обследованы 40 больных, оперированных по поводу ИКМТ на базе ГKB № 7 г. Красноярска. Забор материала для бактериологического исследования проводили при соблюдении правил асептики интраоперационно или в первые сутки до назначения антибактериальной терапии, на 5 – 7, 10 – 14 сутки. Кожу вокруг раны обрабатывали антисептиком, удаляли с помощью стерильной салфетки некротические массы, детрит, гной. Проводили иссечение участка гнойной раны на всю ее глубину. В качестве исследуемых материалов использовали биоптат, который в стерильных условиях взвешивали, растирали в ступке с физиологическим раствором из расчета 1:10. Для определения качественного и количественного состава бактерий в биоптате, посев производился методом Gould на кровяной агар, желточно – солевой агар, среду Эндо.

Идентификацию исследуемых культур проводили на основании морфотипических, культуральных и биохимических свойств. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом и методом скрининга для культуры стафилококка на агаре Мюллера-Хинтона в соответствии с Международными рекомендациями CLSI.

Результаты исследования: В первые сутки обследования микрофлора у 40 больных с диагнозами: абсцессы, флегмонозные и рожистые воспаления, была представлена преимущественно Грам положительными микроорганизмами, на долю которых приходилось 72,73 %. Наиболее часто встречался *S. aureus* (36,36 %) Остальной спектр микроорганизмов был представлен: *Staphylococcus spp.*, *A. baumannii*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. В 77,8 % случаев выделенные микроорганизмы были представлены ассоциациями (*S. aureus*, *Staphylococcus spp.*, *A. baumannii*). Микроорганизмы высевались в этиологически значимом количестве $5,1 \times 10^6$ КОЕ/мл.

На 5 – 7 сутки госпитализации было обследовано 23 больных. Отмечено присоединение *Acinetobacter baumannii* (47%), что могло свидетельствовать о присоединении внутрибольничной инфекции. *S. aureus* был выявлен в 50 % случаев. Ассоциации микроорганизмов, выделявшиеся у большинства больных, встречались в 66,7 % случаев. Микроорганизмы высевались в этиологически значимом количестве $2,21 \times 10^5$ КОЕ/мл. На 10 – 14 сутки госпитализации было обследовано 4 больных. Спектр микроорганизмов был представлен *Corynebacterium spp.* (33,3%), *Acinetobacter baumannii* (33,3 %), *S. aureus*. (33,3 %).

У основных возбудителей ИКМТ исследована чувствительность к антимикробным препаратам. При выборе спектра тестируемых антибиотиков учитывали особенности их фармакокинетики и природную резистентность микроорганизмов. У всех выделенных штаммов *S. aureus* было проведено определение чувствительности к метициллину методом скрининга. 11,7 % штаммов оказались метициллинрезистентными (MRSA).

Штаммы *A. baumannii* в 100 % случаев оказались чувствительными к меропенему, в 20 % - к амикацину, цефепиму, цефоперазону, в 80 % - к гентамицину, и в 33,3 % - умеренно устойчивы к ципрофлоксацину (рис.).

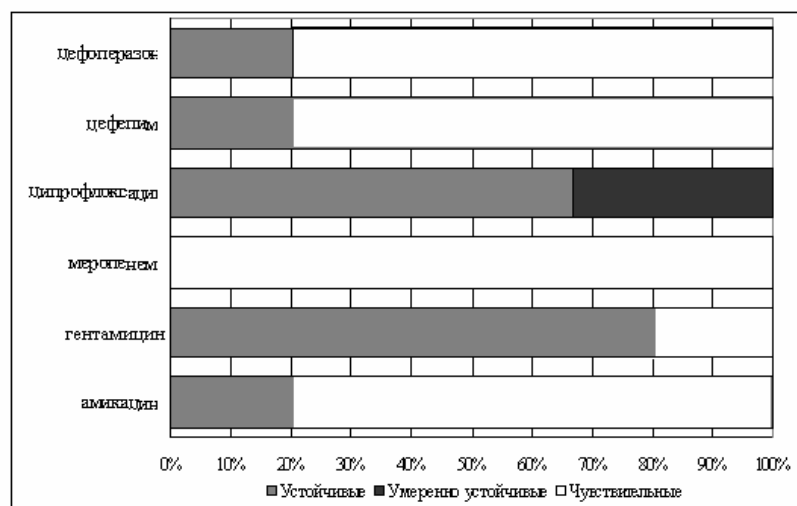


Рис. Результаты антибиотикочувствительности выделенных штаммов *A. baumannii*.

Выводы:

1. Микрофлора гнойных ран у изученных пациентов преимущественно представлена стафилококками (60 %), выделяющимися в количестве, превышающем этиологически значимый порог (10^5 КОЕ/мл).
2. При исследовании микрофлоры гнойных ран больных с инфекциями кожи и мягких тканей в динамике заболевания выявили присоединение полирезистентных штаммов *A. baumannii*, что, возможно, свидетельствует о внутрибольничном инфицировании.

РОЛЬ БЕЛКОВ ABC – ТРАНСПОРТЕРОВ В РАЗВИТИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Смирнова Е.Н.

Сибирский Федеральный Университет, Красноярск
Красноярский филиал Гематологического научного Центр МЗСР РФ
Красноярский научный центр СО РАН

Цель настоящего исследования – разработка подходов к определению активности белков ABC – транспортеров у конкретных пациентов с острыми лейкозами. В задачи работы входил анализ результатов цитотоксического теста и подбор оптимальной смеси для криоконсервации blasts.

Материалы и методы: Объектом исследования служила периферическая венозная кровь от пациентов с острым миелобластным лейкозом. Лейкоциты, выделенные из цельной крови на градиенте плотности фиколл-верографин, культивировали в течение 72 ч в полной питательной среде.

При определении оптимальной смеси для криоконсервирования blasts клетки охлаждали в присутствии различных криопротекторов (50 % эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), 100 % ЭТС, смесь из 20 % ЭТС и 20

% диметилсульфооксида (ДМСО), затем замораживали при -80 °С в течение недели.

При проведении цитотоксического теста лейкозные клетки инкубировали в присутствии различных концентраций исследуемых цитостатических препаратов (даунорубицин и цитарабин). В качестве контроля инкубировали клетки без цитотоксических препаратов. Через 48 ч оценивали жизнеспособность клеток на проточном цитофлюориметре с использованием пропидиум иодида.

Для оценке активности ABC-транспортеров клетки инкубировали в течение 10 минут с даунорубицином (2 мкг/мл) и измеряли уровень флуоресценции, характерный для даунорубицина.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью стандартной прикладной программы MicrosoftExcel 2010.

Результаты: На Рис. 1 отображено влияние различных криопротекторов на выживаемость лейкозных клеток при замораживании, из которого видно, что наиболее подходящим криопротектором является смесь из 20 % ЭТС и 20 % ДМСО (во всех случаях $p < 0,05$, различия достоверны).



Рис.1. Процент мертвых клеток после криоконсервации

В таблице 1 представлены результаты по влиянию различных концентраций даунорубицина и цитарабина на выживаемость опухолевых клеток, полученных от разных пациентов, и на клетки линии hek 293 (положительный контроль). Все пациенты имели повышенную устойчивость к воздействию даунорубицина и цитарабина.

Таблица 1 – Процент мертвых клеток после обработки их даунорубицином и цитарабином

Концентрации цитостатиков в культуре	hek293		I		II		III		IV	
	DR	Ara - C	DR	Ara - C	DR	Ara - C	DR	Ara - C	DR	Ara - C
10x	41,3	10,7	9,0	0,1	8,5	0,1	14,2	0,1	16,9	0,1
1x	41,2	10,4	2,5	0,1	0,1	0,1	0,8	0,1	8,3	0,1
0,1x	39,0	6,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,7	0,1
0,01x	37,9	4,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	3,1	0,1
0,001x	35,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,0001x	28,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,00001x	25,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,000001x	23,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

В эксперименте оценки активности белков транспортеров видно, что клетки обоих пациентов (с клетками других пациентов опыт не проводился) активно выкачивали даунорубин (Рис.2.).



Рис.2. Смещение пика флуоресценции опухолевых клеток пациентов в присутствии даунорубина (2 мкг/мл) относительно клеток линии hek 293 (положительный контроль)

Результаты свидетельствуют о высокой активности ABC-транспортеров у данных пациентов, что согласуется с ранее приведенным цитотоксическим тестом. Кроме того, полученные результаты согласуются с клиническими данными проведения химиотерапии этих пациентов, у которых выявлена лекарственная устойчивость к цитостатическим препаратам, назначенным в курсе лечения.

Выводы:

1. Для криоконсервации лейкозных клеток лучше всего использовать смесь из 20 % ЭТС и 20 % ДМСО.
2. Цитотоксический тест и оценка активности ABC-транспортеров перспективны для использования в качестве диагностического метода оценки уровня множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток крови у пациентов при острых лейкозах
3. Необходимы дальнейшие, более обширные исследования.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ БИОМАТЕРИАЛОВ

Смирнова Е.Ю.¹, Шевцова А.О.²

¹Сибирский Федеральный Университет,
²Гематологический центр, Красноярск, Россия
e-mail: sme1989@mail.ru

Для токсикологических исследований биоматериалов используется комплекс методов, позволяющих оценить их цитотоксичность и влияние на метаболические процессы в тканях-мишенях. Оценка токсикологических характеристик биоматериалов является обязательным этапом. Одним из важнейших токсикологических показателей является состояние антиоксидантной защитной системы, включающих оценку продукции АФК, содержания продуктов перекисного окисления липидов и активности

антиоксидантных ферментов, в число которых входит глутатион-S-трансфераза (GST). GST катализируют огромное множество реакций, которые обезвреживают соединения, представляющие собой различные токсические вещества, канцерогены, мутагены, цитостатики, пестициды.

Однако используемые для этих ферментов колориметрические методы трудоемки и требуют большой объем образца.

Цель нашего исследования - адаптировать метод определения активности антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы для работы на биохимическом анализаторе, позволяющем сократить время анализа и минимизировать объемы исследуемых проб.

Материалы и методы: Объектом исследования служила плазма практически здоровых людей. Кровь забирали из локтевой вены в вакутейнер обработанный гепарином, затем кровь центрифугировалась при 3000g. Для исследований отбирали плазму. Модифицировались методики определения активности глутатион-S-трансферазы. Активность ферментов определяли кинетическим методом на спектрофотометре Spekol и подбирались условия для биохимического анализатора Sapphire-400 (Tokyo BOEKI LTD). Метод определения активности GST основан на изменении оптической плотности вследствие образования глутатион-S-конъюгатов между GSH и ХДНБ.

Результаты: На начальном этапе работы построены калибровочные графики для GST. В качестве калибраторов использовали коммерческие препараты ферментов фирмы Sigma (препарат содержал 5 мг фермента, активность – 41 ед/мг белка), готовили стандартные (стоковые) и рабочие растворы, которые использовали для построения калибровочных кривых. Перед построением калибровочного графика на биохимическом анализаторе необходимо было разработать программу-методику для фермента: задать длину волны измерений, объемы реагентов и биообразца, также саму программу измерения оптической плотности продуктов реакции, исходя из расчетов циклов прибора. В ходе создания программы использована двуреагентная методика для GST (Habig et al., 1990).

Построенные калибровочные графики для GST приведены на рис. 1, из которого следует, что калибровочные графики для GST, построенные по результатам измерений на спектрофотометре и на анализаторе (рис.1 А и Б), сопоставимы. Это позволяет измерять активность фермента на биохимическом анализаторе.

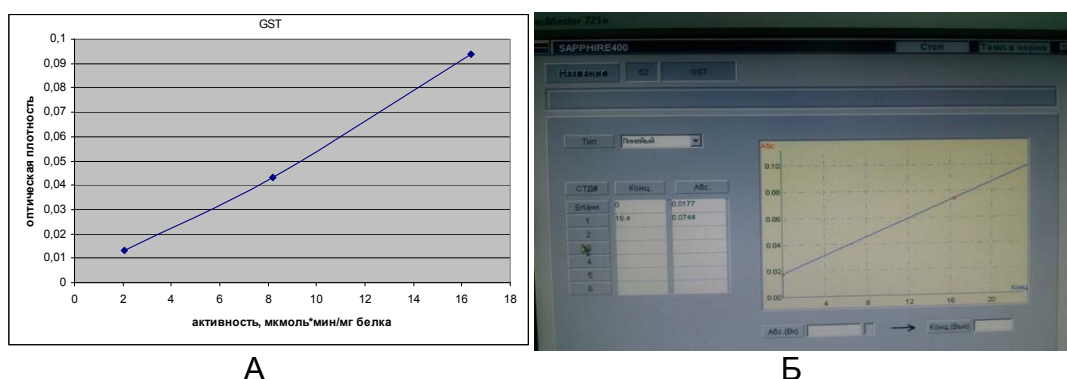


Рисунок 1. Калибровочный график активности GST, полученный на спектрофотометре (А) и на биохимическом анализаторе (Б).

Для выявления возможности взаимозаменяемости приборов проведено сравнение показателей активности фермента и выявление степени различия между значениями активности. Сравнительный анализ активности GST, выполненный на спектрофотометре, составил (35,7;31,3-38,4 мкмоль*мин/мл плазмы), на биохимическом анализаторе - (39,1;36,8-41,3 мкмоль*мин/мл плазмы). Результаты свидетельствуют о том, что приборы взаимозаменяемы.

В результате выполненного исследования адаптирован метод определения активности антиоксидантных ферментов для биохимического анализатора. Минимизированы объемы биообразцов (10 мкл) и используемых реагентов применительно к плазме, оптимизирован состав инкубационной пробы, подобрана программа определения активности ферментов. Сравнение модифицированных методов определения активности глутатион-S-трансферазы с оригинальными свидетельствует о их взаимозаменяемости.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА НА УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН ИЗОЛИРОВАННОЙ ПЕРФУЗИРУЕМОЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

А.А. Калачев

*Сибирский федеральный университет,
andrej-kalachev@yandex.ru*

Физиологические и патофизиологические эффекты кобальта разнообразны. Есть сведения о влиянии его на состояние миокарда, на функцию щитовидной железы, метаболизм углеводов и липидов. Согласно современным представлениям, при попадании в организм кобальт имитирует в клетках состояние кислородного голодания, сопровождающееся серьезными изменениями углеводного метаболизма.

Особую роль в метаболизме углеводов у млекопитающих играет печень. Изолированная перфузируемая печень лабораторных животных – удобная экспериментальная модель для исследования физиологических и биохимических аспектов реакции организма на любые воздействия. Печень выполняет барьерную, детоксикационную функцию, обезвреживая ядовитые вещества, которые образуются в процессе метаболизма или поступают извне.

Цель работы — выявить особенности метаболизма углеводов в изолированной перфузируемой печени крыс, подвергшихся воздействию хлоридом кобальта.

Материалы и методы: В процессе работы оценивали параметры углеводного обмена печени крыс, подвергшихся примедикации хлоридом кобальта, и печени интактных крыс (импеданс сосудов, скорость продукции желчи, потребление кислорода, концентрации глюкозы и лактата в перфузионной среде).

Результаты: Выявлено, что динамика импеданса сосудов и потребление кислорода для органа, подвергшегося воздействию как хлоридом кобальта, так и лактатом натрия, сходны. При наличии в среде лактата натрия в оттекающем перфузате содержание глюкозы выше, чем в исходной среде, а после предварительного воздействия хлоридом кобальта уровень глюкозы в оттекающем перфузате не отличается от исходного.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что введение за сутки до операции хлорида кобальта приводит к адаптационным изменениям в организме животного. Функциональная нагрузка лактатом в отсутствие хлорида кобальта, вызывает смещение углеводного обмена в сторону накопления глюкозы.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ МЕТОДОМ ЯМР-ТОМОГРАФИИ

Хилажева Е.Д.

Сибирский федеральный университет, Красноярский научный центр СО РАН
e-mail: elena.hilazheva@mail.ru

В последнее время значительное внимание привлекает использование нанообъектов в диагностике и лечении различных заболеваний. Особенно привлекательными в этой области являются ферромагнитные наночастицы, уникальные свойства которых позволяют использовать их в качестве агентов для целевой доставки лекарственных препаратов, управляемой гипертермии, а также в качестве контрастирующих агентов для ЯМР-томографии.

Используемые в работе железосодержащие магнитные наночастицы получены в культуре бактерий *Klebsiella oxytoca*, выделенных из сапропеля озера Боровое Красноярского края. В процессе жизнедеятельности бактерии синтезируют наночастицы минерала ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ферригидрит относится к антиферромагнетикам, но вследствие малого размера частиц магнитные моменты ионов Fe^{3+} , находящиеся на поверхности частицы, оказываются некомпенсированными, и формируют “паразитный” интегральный магнитный момент отдельной частицы. Это свойство может активно использоваться в медицине. Так, уже было показано, что с помощью магнитного поля можно управлять передвижением данных наночастиц в хрящевой и костной тканях *in vitro*.

Но для того, чтобы данные наночастицы могли найти широкое применение в медицине, необходимо знать, как они будут распределяться в организме при различных формах введения, так как от возможности достижения частицами клеток-мишеней зависит характер их воздействия на организм.

Для выявления магнитных наночастиц в организме наиболее подходит метод ЯМР-томографии, позволяющий детектировать частицы благодаря дипольным взаимодействиям с ними молекул воды. Особенно важным представляется, что данный метод позволяет проводить прижизненные исследования, а также позволяет избежать трудностей визуализации, связанных с малым количеством наночастиц, надежной адсорбции к ним различных меток, и методологических проблем, связанных с использованием радиоактивных материалов.

В работе с помощью метода ЯМР-томографии исследовано распределение железосодержащих магнитных наночастиц в организме лабораторных животных (мышей) и возможность их использования в качестве контрастирующих агентов для ЯМР-томографии.

АПТАМЕРЫ КАК СРЕДСТВО ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

Замай Г.С., Замай Т.Н.

Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Россия

e-mail: zamayonka@mail.ru

Цель работы – подбор аптамеров к опухолевой ткани легкого человека методом SELEX и исследование биологического влияния аптамеров на опухолевые и нормальные клетки легкого человека.

Материалы и методы: Для получения аптамеров к ткани рака легкого человека использовали послеоперационный материал ткани рака легкого человека и прилежащей к ней здоровой ткани легкого, предоставленной Красноярским краевым онкологическим центром.

Гистологический тип рака легкого человека при получении аптамеров не учитывали. В первом раунде осуществляли инкубацию 100 нМ библиотеки олигонуклеотидов, меченой флуоресцентной меткой Alexa-480 с биологической мишенью (тканью рака легкого человека) в 500 мкл буфера Хенкса в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере (позитивная селекция). Затем ткань центрифугированием при 3500 об/мин в течение 3 мин освобождали от несвязавшихся олигонуклеотидов и отмывали один раз в 100 мкл буфера Хенкса. Связавшиеся олигонуклеотиды, находящиеся в осадке после центрифугирования, отделяли от биологической мишени с помощью денатурирования в 50 мкл ТЕ-буфера при 95°C с последующим осаждением 3500 об/мин в течение 15 мин. Далее надосадок собирали и проводили симметричную и асимметричную полимеразные цепные реакции.

Смесь для проведения симметричной и асимметричной полимеразной цепной реакции включает в себя: 2 мкл dNTP, 2 мкл праймеров (для симметричной- F4,R4 праймеры; для асимметричной - R4, Alexa- меченый праймер), 2 мкл буфера для Taq-полимеразы, 0,1 мкл Taq-полимеразы, 14,9 бидистиллированной воды MQ, 2 мкл аптамеров-кандидатов. Продуктами асимметричной полимеразной реакции были аптамеры-кандидаты первого раунда селекции; на этом цикл замыкался и начинался следующий раунд SELEX.

Второй и все последующие раунды начинали с негативной селекции аптамеров-кандидатов со здоровой тканью легкого в 500 мкл PBS-буфера на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее проводили центрифугирование при 3500 об/мин в течение 3 мин и собирали надосадок. С собранным надосадком осуществляли позитивную селекцию с тканью рака легкого в 500 мкл буфера Хенкса на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего центрифугировали, отмывали в 100 мкл буфера Хенкса. Связавшиеся олигонуклеотиды отделяли от биологической мишени с помощью их денатурирования при 95°C 50 мкл ТЕ-буфера с последующим осаждением при 4500 об/мин в течение 15 мин. После чего из собранного надосадка проводили симметричную и асимметричную полимеразные цепные реакции.

Всего было сделано 13 таких раундов. В результате были получены аптамеры с флуоресцентной меткой Alexa-480.

Наличие одноцепочечной ДНК в ПЦР-продукте отслеживали с помощью агарозного гель-электрофореза. Для этого исследуемые образцы (ПЦР-продукты) в буфере для внесения наносили на 3 % агарозный гель и разгоняли в камере для горизонтального электрофореза. Для детекции флуоресценции

одноцепочечных ДНК меченных Alexa-488 использовали геле-документирующую систему GBOX/EF2-E. Одноцепочечные ДНК-аптамеры отделяли от компонентов ПЦР-смеси с помощью cut off фильтров Pall Centrifugal devices. Концентрацию одноцепочечных ДНК-аптамеров в выбранных пулах определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000 Thermoscientific.

Специфичность связывания аптамеров с опухолевой тканью легкого человека осуществляли с помощью проточной цитофлуориметрии. Для этого полученные аптамеры инкубировали с тканью рака легкого в течение 30 мин при комнатной температуре. Флуоресценцию исследуемых аптамеров, связавшихся с мишенью, определяли на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Cytomics FC 500.

Дополнительно специфичность связывания аптамеров с опухолевой тканью легкого человека определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Для этого аптамеры к раку легкого человека инкубировали с опухолевой и нормальной тканью легкого человека, далее связывание проверяли под флуоресцентным микроскопом Olympus BX.

Результаты: С использованием проточной цитофлуориметрии установлено, что наибольшей специфичностью к тканям рака легкого человека обладают аптамеры 10 раунда. Связываемость аптамеров к тканям рака легкого человека с нормальными тканями легкого человека не установлена.

Кроме того, пул аптамеров 11 раунда селекции был проверен на специфичность связывания со своей мишенью с помощью флуоресцентной микроскопии. Аптамеры к опухолевой ткани легкого человека не связывались со здоровой тканью легкого, поэтому флуоресценции не обнаружено. При инкубации аптамеров со своей мишенью (опухолевой тканью легкого) появлялась флуоресценция ткани, свидетельствовавшая о связывании с аптамерами, которые имели флуоресцентную метку.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУННЫХ КЛЕТОК В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМой ЭРЛИХА Кравец А.Ю.

*Сибирский федеральный университет, КНЦ СО РАН, Красноярск,
Россия
e-mail: Smeshilka@list.ru*

Цель работы - определение уровня хемилюминесценции в клетках асцитной жидкости у мышей с АКЭ.

Материалы и методы: В работе использовали перевиваемый штамм асцитной карциномы Эрлиха, пассируемой внутрибрюшинно на мышях самцах ICR, весом 20-25 г, в возрасте 3-4 мес. Мыши получены в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская обл.).

Опухоль вводили в каждую мышь в количестве 3×10^6 клеток в 0,2 мл 0,9 % NaCl. Отбор опухоли в процессе эксперимента проводили на 5, 9, 11, 13, 15 сут развития опухоли, считая день прививки первым днем роста опухоли.

Животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. Далее отбирали жидкость из различных отделов брюшной полости. Клетки полученной суспензии отмывали от асцитической плазмы путем трехкратного чередования циклов центрифугирования и последующего ресуспендирования.

Реистрировали спонтанную и индуцированную хемилюминесценцию образцов в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе "CL3604" (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через микро ЭВМ IBM/ PC/ AT.

Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум интенсивности (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}) и площади (S) под хемилюминесцентной кривой.

Результаты измерения люминолзависимой хемилюминесценции клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей в динамике роста опухоли представлены на рис. 1.

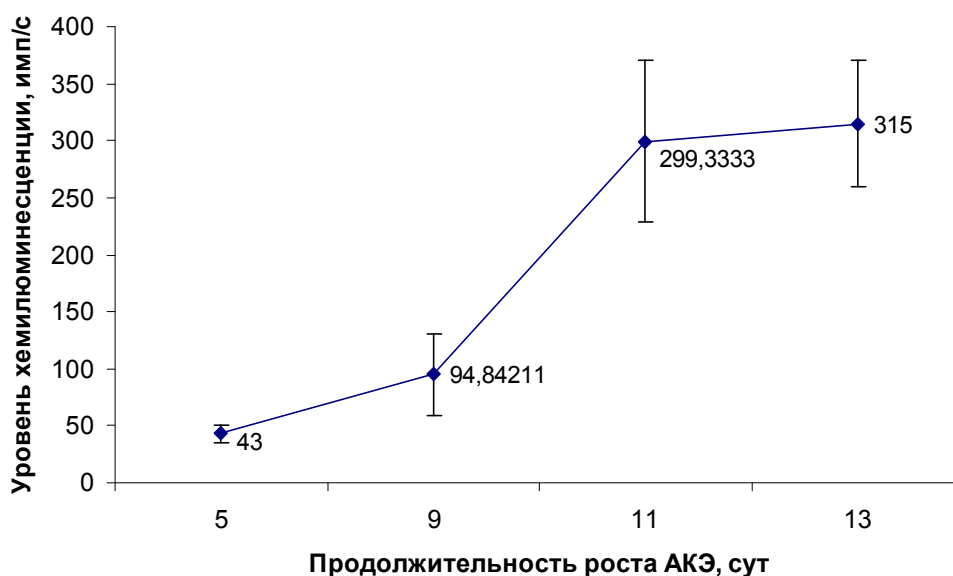


Рис.1 Люминолзависимая хемилюминесценция клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей в динамике роста опухоли

Показано, что спонтанное свечение в суспензии клеток возрастает к последним дням эксперимента в случае использования люминола в качестве активатора. Эти показатели резко отличаются от свечения иммунных клеток в присутствии люцигенина (рис.2) во временном диапазоне 5-11 сут эксперимента, однако в обоих случаях I_{max} резко увеличивается на 15 сут. Такие различия можно, по-видимому, объяснить тем, что метод определения люминесценции, в котором в качестве активного компонента служит люминол, считается не слишком специфичным в отличие от того же опыта с применением люцигенина.

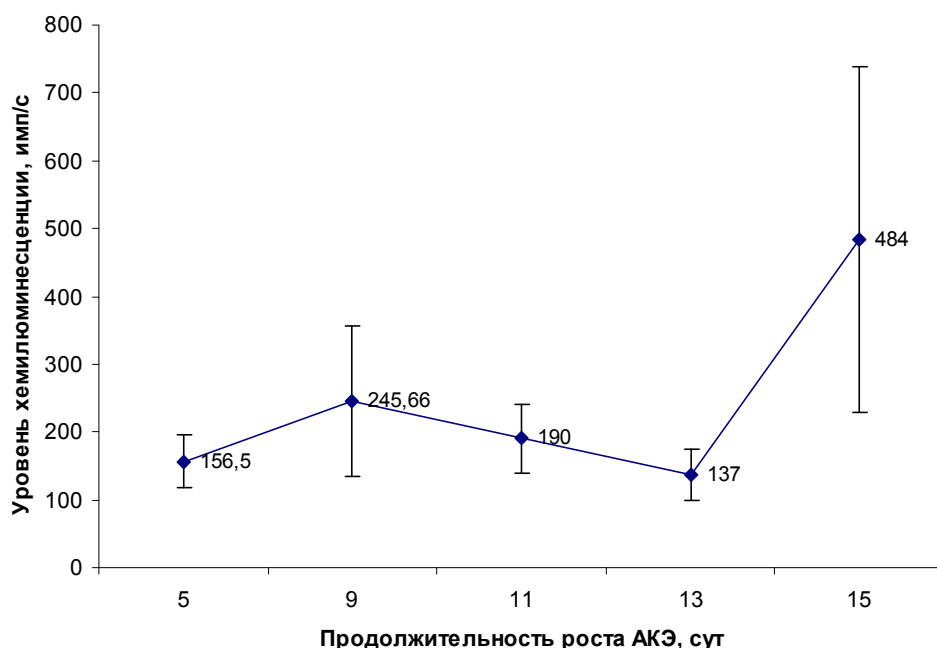


Рис.2 Люцигенинзависимая хемилюминесценция клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей в динамике роста опухоли

Низкий показатель свечения, присущий клеткам на пятые сутки развития опухоли (156,5 имп/с) говорит о недостаточной иммобилизации иммунной системы животных в этот период.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ ДЕТОКСИКАЦИИ РАСТВОРОВ СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ ГУМИНОВЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Кислан С. Л.¹, Тарасова А. С.¹, Кудряшева Н. С.^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО РАН,
Красноярск, Россия
e-mail: stepa87@gmail.com

Известно, что соли металлов являются распространенными загрязнителями и часто присутствуют в стоках промышленных предприятий. Одним из способов снижения токсичности вредных соединений является применение гуминовых веществ – продуктов разложения органической массы в почве. Гуминовые вещества – продукты естественной трансформации (окисления и полимеризации) органических веществ в почве и донных отложениях; процессы гумификации, трансформации и миграции гуминовых веществ – вторые по массопереносу в природе после фотосинтеза.

Цель работы - изучение влияния гуминовых веществ на токсичность растворов неорганических загрязнителей – солей металлов переменной зарядности. В качестве модельных загрязнителей использовали следующие соединения: CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, CoCl_2 , $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ и CrCl_3 . Токсичность их растворов определяли с помощью биолюминесцентного ферментативного теста – биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза, а также лиофилизированных бактерий *Photobacterium phosphoreum*.

Материалы и методы: Принцип использования тест-систем основан на корреляции между изменением интенсивности биолюминесценции и токсичностью среды. При этом экзогенные токсичные вещества либо ингибируют, либо активируют биолюминесценцию [1]. Токсичность растворов солей оценивали с помощью C_{50} – концентрации соли (М), ингибирующей биолюминесценцию на 50 %.

В модельные растворы солей металлов вносили гуминовые вещества. Исследовали зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации гуминовых веществ при различных временах инкубирования солей металлов с гуминовыми веществами. Время инкубирования варьировало от 0 до 50 минут. Рассчитывали коэффициенты детоксикации (K): $K = I_{s+h} / I_s$, где I_{s+h} – интенсивности биолюминесценции в присутствии солей металлов и гуминовых веществ.

В качестве источника гуминовых веществ использовали препарат Гумат-80 (ООО «Гумат», Иркутск). Использовали концентрации гуминовых веществ $< 2 \cdot 10^{-3}$ М, ингибирующие биолюминесценцию не более, чем на 10 %.

Результаты: Исследованы зависимости интенсивности биолюминесценции от концентраций модельных поллютантов (таблица 1). Показано, что с ростом концентрации растворов солей металлов интенсивность биолюминесценции уменьшается.

Таблица 1 – Значение величин C_{50} и их связь со стандартными редокс-потенциалами E^0 металлов переменной зарядности

Соединение	C_{50} , М	E^0 , В
Двухзарядные соли металлов		
$CuSO_4$	$1 \cdot 10^{-6}$	0,17
$Pb(NO_3)_2$	$5 \cdot 10^{-5}$	-0,13
$K_4[Fe(CN)_6]$	$5 \cdot 10^{-3}$	-0,36
$CoCl_2$	$5 \cdot 10^{-3}$	-1,82
Трехзарядные соли металлов		
$K_3[Fe(CN)_6]$	$8 \cdot 10^{-5}$ [2]	0,36
$Eu(NO_3)_3$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	-0,43
$CrCl_3$	$3 \cdot 10^{-3}$	-0,41

Из таблицы 1 видна связь величины редокс-потенциала (E^0) с токсичностью (C_{50}) растворов солей. Эта зависимость указывает на то, что окислительно-восстановительные свойства солей металлов вносят определяющий вклад в их воздействие на биолюминесцентную систему.

Аналогичные результаты получены и с использованием лиофилизированных бактерий.

Показано, что при отсутствии инкубирования солей металлов с гуминовыми веществами снижения токсичности не наблюдается ($K=1$). При инкубировании более 15 минут наблюдалась детоксикация растворов ($K>1$). Максимальная величина $K=2,40$ получена для времени инкубирования 50 минут для раствора трехзарядного металла Eu^{3+} , и 1,88 – для раствора двухзарядного металла Pb^{2+} . Увеличение детоксицирующего эффекта во времени связано, вероятно, с малыми скоростями процесса комплексообразования с участием металлов и гуминовых веществам.

В работе [2] на примере $K_3[Fe(CN)_6]$ было показано за детоксикацию его растворов ответственны два процесса: связывание солей металлов гуминовыми веществами и ускорение эндогенных НАДН-зависимых окислительно-восстановительных реакций в биолюминесцентной тестовой системе. Вероятно, аналогичные процессы ответственны и за детоксикацию других солей металлов. Количество металлсвязывающих центров у гуминовых веществ порядка 1-2 ммоль/г м.

Изучено влияние $CrCl_3$ и гуминовых веществ на срезы живой культуры *Photobacterium phosphoreum*. Показано, что после обработки ГВ-ами наблюдались остатки слизистой капсулы (стрелки на Рис.1), которая, как предполагается [3], формируется в качестве защитной реакции клетки на неблагоприятное воздействие.

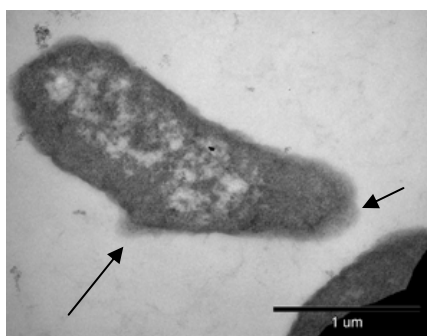


Рис.1 Ультраструктура культуры *P.phosphoreum* в присутствии $CrCl_3$ ($10^{-4}M$) и гуминовых веществ. Масштаб – 1мкм

Таким образом, продемонстрировано уменьшение токсичности растворов солей металлов в присутствии гуминовых веществ. Охарактеризованы эффективность и условия детоксикации. Механизм детоксикации связан с комплексообразовательными и окислительно-восстановительными свойствами гуминовых веществ, а также их способностью стимулировать защитные свойства клеток.

Список литературы:

- [1] E. Vetrova, N. Kudryasheva, V. Kratasyuk, *Photochem. Photobiol. B.*, 6, 35-40 (2007)
- [2] A. S. Tarasova, D. I. Stom, N. S. Kydryasheva, *Environ. Toxicol. and Chem.*, 5, 1013–1017 (2011)
- [3] J. Costerton, *Can.J.Microbiol* 34, 513-521 (1988).

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ И pH РЕАКЦИОННОЙ СРЕДЫ НА КИНЕТИКУ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИФЕРМЕНТНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ

Бука Н.С.¹ , Суковатая И.Е.¹

¹*Сибирский федеральный университет,
г. Красноярск пр. Свободный, 79, Россия
e-mail: bukanina@list.ru*

Для решения фундаментальной задачи понимания механизмов сопряжения и функционирования ферментативных метаболических цепей в

клетке разрабатываются экспериментальные походы для создания экспериментальной модели, которой позволит реконструировать цепь сопряжения люциферазы с другими ферментами светящихся бактерий в клетке. Для имитации вязкого микроокружения ферментов, а также связи с мембранными структурами и оптимизация микроокружения может быть достигнута, в том числе за счет увеличения вязкости микроокружения ферментов по сравнению с растворами.

Цель работы - изучение влияния температуры и pH на функционирование ферментов в экспериментальных моделях биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза, помещенных в растворы сахарозы и глицерина (ЭМсахароза и ЭМглицерин). Эти исследования необходимы для понимания роли этих факторов сначала в вязких средах, и затем уже в клетках светящихся бактерий.

Материалы и методы: Измерения кинетических параметров (интенсивность свечения, константу спада и квантовый выход) проводили на биолюминометре *Temer BioSystems (Temer BioSystems, Sunnyvale, USA)*.

Результаты: Экспериментально изучены кинетические параметры сопряженной биолюминесцентной биферментной системы в вязких растворах сахарозы и глицерина и в буферном растворе с низкой вязкостью при изменении pH: получены зависимости кинетических характеристик (интенсивности свечения, константы спада биолюминесценции, квантового выхода и др.) от pH на прототипах экспериментальных моделей ЭМсахароза и ЭМглицерин и в растворе.

Для реализации поставленной задачи были проведены ряд экспериментов, в ходе которых были получены наборы кинетических характеристик бактериальных биолюминесцентных систем НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза, функционирующих в условиях различной вязкости, а также при варьировании pH: использовали следующие значения pH: 5,8; 6,4; 6,9; 7,3; 7,8. Как правило, каждый эксперимент проводили не менее чем в трех повторностях. Статистическая обработка полученных экспериментальных результатов проводилась методом наименьших квадратов с использованием пакета программ Excel for Windows-XP. Разброс полученных значений не превышал 10%

Показано, что увеличение вязкости реакционной среды для биолюминесцентной биферментной бактериальной реакции приводит к уменьшению максимального значения интенсивности свечения и константы спада при различных значениях pH. Значения pH–оптимума изменяется при введении в реакционную смесь только высоких концентраций глицерина и сахарозы. Зависимости интенсивности биолюминесценции биферментной биолюминесцентной системы от вязкости как сахарозы, так и глицерина практически совпадают при всех исследуемых значениях pH (5,8; 6,4; 6,9; 7,3 и 7,8), следовательно, природа растворителя не является фактором, определяющим изменение интенсивности свечения биолюминесценции. В прототипах экспериментальных моделей ЭМсахароза увеличение вязкости реакционной среды до 3 мПа·с при значениях pH равных 5,8; и 7,8 наблюдается стабилизация возбужденного интермедиата. В прототипах экспериментальных моделей ЭМглицерин уменьшение времени жизни долгоживущего интермедиата наблюдали при всех исследуемых значениях pH. В прототипах экспериментальных моделей ЭМглицерин происходит увеличение испускания числа квантов, тогда как прототипах экспериментальных моделей ЭМсахароза квантовый выход не изменяет существенно.

Полученные результаты могут служить основой для разработки методики конструирования экспериментальных моделей ЭМсахароза и ЭМглицерин, обеспечивающие стабильность и высокий выход активности биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза.

Работа выполнена при поддержке грантов:

- грант № 2.2.2.2/5309 Министерства образования и науки РФ, Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы», проект «Моделирование процессов функционирования сопряженных ферментативных систем в клетке на примере ферментов светящихся бактерий», 2009-2011;
- грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы», проект «Биolumинесцентный анализ молекулярных процессов в клетках и их физико-химических моделях; создание на их основе нового поколения биolumинесцентных сенсоров для биологии и медицины», контракт № 02.740.11.0766.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ПОДХОД К КОНТРОЛЮ ТРЕНИРОВОЧНОГО ПРОЦЕССА

Кратасюк В. А., Черняев В. А.

*Сибирский Федеральный Университет. Россия 660036 г. Красноярск
bascinet@mail.ru*

В настоящее время известно несколько физиологических методов определения реакций организма человека на физическую и умственную нагрузку, такие как измерение гемодинамики, определение максимального потребления кислорода (МНК), показателей анаэробного обмена (ПАНО) и ряд других [1]. К недостаткам известных методов относятся их длительность, сложность проведения анализа, трудоемкость, необходимость предварительной пробоподготовки в лаборатории, инвазивность при анализе сыворотки и плазмы крови.

Вместе с тем, этих недостатков лишен биolumинесцентный метод контроля тренировочного процесса [2], основанный на анализе влияния слюны на интенсивность реакции биolumинесценции, катализируемой биферментной системой: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза - люцифераза в зависимости от степени: физической нагрузки спортсменов. Однако ранее метод был применен только для небольшой группы спортсменов, занимающихся классическими единоборствами, что делает необходимым исследование закономерностей влияния слюны при занятиях другими видами спорта и статистическое подтверждение валидности и границ применения нового метода.

Цель работы - выбор условий применения биolumинесцентного метода для контроля тренировочного процесса в одном из видов ЛФК – иппотерапии, а также повторяемости эффекта на группе студентов, получающих физическую нагрузку.

Материалы и методы: Изучены условия подготовки пробы слюны. Пробы слюны следует анализировать не позднее чем через 5 часов после сбора, в противном случае происходят изменения в составе слюны, влияющие на точность анализа. Слюну также следует центрифугировать для осаждения остатков пищи и зубного налета. Для определения эффекта разбавления

изучали действие различных количеств дистиллированной воды на интенсивность свечения биферментной системы и светящихся бактерий (Io/Ik).

Результаты: Установлено, что для системы *in vitro* влияние разбавления начинается с 150 мкл воды. При добавлении воды в меньших количествах, интенсивность свечения изменяется в пределах ошибки. Таким образом, объем анализируемого образца не должен превышать 150 мкл.

Показана принципиальная возможность использования биферментной системы: НФДН:ФМН-оксидоредуктаза - люцифераза для контроля тренировочного процесса. В серии экспериментов было показано различное действие на систему *in vitro* проб слюны испытуемых, взятых до и после нагрузки. При этом обнаружена индивидуальная реакция организмов пациентов и студентов на физическую нагрузку: величина интенсивности свечения либо увеличивается, либо уменьшается при возрастании нагрузки. Кроме того, имеются индивидуальные различия в степени изменения этого параметра.

В соответствии с реакциями биотеста все испытуемые спортсмены и студенты получающие нагрузку были разделены на 3 группы:

1. Интенсивность свечения увеличивается после ЛВЕ
2. Интенсивность свечения уменьшается после ЛВЕ
3. Интенсивность свечения не изменяется

Большинство исследуемых относятся к 1 группе. Было исследовано влияние некоторых факторов (возраст, пол, заболевание, тип питания и др.) на результаты анализа. Однако, проведенные эксперименты не дали однозначного результата, по видимому, из-за недостаточного количества исследуемых пациентов. Получен результат о повторяемости эффекта, на основании которого можно оценить возможность существования данного подхода.

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Яковлев Н.Н. Биохимия спорта. //Физкультура и спорт - 1987. - N5. - С.21-27.
- 2) Гриценко Е.В., Бородулин С. В., Бытев В. О., Кратасюк В.А. БиOLUMИнесцентный контроль тренировочного процесса.// Сборник материалов 7 Всероссийской конф. по гомеостазу, апрель, 1996., С. 232-233.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ МУТАЦИИ В ГЕНЕ ФАКТОРА ЛЕЙДЕНА И ЕЁ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ У СПОРТСМЕНОВ РАЗРЯДНИКОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ В сфу

Руденко Н.В.^{1,2}, Петухова А.В.^{1,2}, Суховольская М.А.^{1,2}, Шайхутдинова Р.В.^{1,2}

*Сибирский Федеральный Университет,¹ Красноярский филиал ФГБУ Гематологический научный Центр Минздравсоцразвития России²
г.Красноярск, пр.Свободный 81 – 318, Россия
e-mail: nrudnko@gmail.com*

В процессе интенсивной мышечной деятельности и адаптации к ней происходит значительная перестройка метаболических процессов и следовательно изменения в работе всех систем и органов. Далеко не последняя роль в приспособлении к действию физической нагрузки принадлежит системе крови, лимитирующей наряду с кардио-респираторной системой уровень кислородообеспечения работающих органов.

В результате действия физической нагрузки увеличивается как объем, так и скорость кровотока. Наряду с этим повышается вязкость крови, что в совокупности с «гемодинамическим ударом», увеличением сосудистого сопротивления приводит к ухудшению реологических свойств крови, затруднению работы сердца и неадекватному мощности выполняемой физической нагрузки уровню доставки кислорода.

«Рабочая гемоконцентрация» за счет выброса депонированной крови приводит к миогенному эритроцитозу, лейкоцитозу, тромбоцитозу. В результате высокой скорости кровотока, «гемодинамического удара» имеет место повреждение форменных элементов крови и выделение из них факторов, оказывающих активирующее влияние на систему гемокоагуляции.

Немаловажное значение в появлении гиперкоагуляционного потенциала крови играет гипоксия, увеличивающаяся с ростом мощности выполняемой мышечной работы. Гипоксия изменяет содержание и активность ряда компонентов системы гемокоагуляции. В результате активизации симпато-адреналовой системы в кровоток секретируется значительное количество катехоламинов, запускающих каскадные реакции плазменных факторов гемостаза - XII, являющегося триггером внутреннего пути активации протромбина, факторов V, VII и VIII, участвующих в непосредственных реакциях образования протромбина и в дальнейшем стабильной гемостатической пробки. Описанные механизмы гиперкоагуляции приводят к риску образования тромбов и, как следствие, к сосудистым катастрофам.

На сегодняшний день известно, что мутация в гене V фактора свертывания, обусловленная заменой нуклеотида гуанина на аденин в положении 1691. Это при трансляции белка приводит к изменению аминокислотной последовательности V фактора свертывания крови, в положении 506 аргинин замещается глутамином. Такой измененный V фактор свертывания принято называть фактором Лейдена (rs6025).

Это приводит при реализации противосвертывающих механизмов к повышенной устойчивости данного фактора к разрушающему действию активированным протеином C и как следствие к гиперкоагуляции.

Интенсивные исследования последних лет показали, что мутация Лейдена широко распространена на скандинавском полуострове - 15%, в Европейской популяции частота встречаемости этой мутации составляет 4,4%.

Цель работы - определение частоты мутации в гене фактора Лейдена и у спортсменов имеющих спортивный разряд и обучающихся в СФУ, а также фенотипического проявления этой мутации.

Материалы и методы: Взятие крови производили натошак из локтевой вены с помощью закрытой вакуумной системы. В качестве антикоагулянта использовался ЭДТА. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПО Литех). Далее проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с электрофоретической детекцией (наборы «SNP-экспресс», НПО Литех). Для исследования фенотипического проявления мутации были проведены коагулогические тесты на автоматическом коагулометре Sysmex CA-560 с помощью РеаPrC/FV теста. Протромбиновое время и протромбиновый индекс определяли хронометрическим методом по Квику с использованием коммерческих реактивов НПО Ренам.

Результаты: В процессе исследования было обследовано 63 спортсмена. В результате у 4-х человек было выявлено гетерозиготное

носительство мутантного аллеля, что составило 6,3% от общего числа исследуемых спортсменов. Гомозиготной формы мутантного аллеля в гене фактора V Лейдена не обнаружено. Фенотипическое проявление данной мутации было обнаружено у всех гетерозигот в виде резистентности фактора Лейдена к разрушающему действию активированным протеином C.

ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Вашкевич П.В. Малышева Е.А.

*Сибирский Федеральный Университет. Россия 660036 г. Красноярск
e-mail: peter007@inbox.ru*

Цель работы: изучение влияния бетулина и арабиногалактана на функциональное состояние клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ).

Материалы и методы: Объектом исследования служили асцитные клетки карциномы Эрлиха, взятые на 9-ые сутки после ее трансплантации белым мышам-самцам ICR. Асцитные клетки промывали средой Хенкса, после чего использовались для исследования. Для соблюдения стерильности все манипуляции при работе с клеточными культурами проводили в ламинар-боксе.

Забранные клетки помещали в питательную среду объемом 3 мл. К ним добавляли FBS 300 мкл (эмбриональная бычья сыворотка) и в равной мере ампицилин и канамицин (чтобы не допустить случайного роста бактерий в культуре). Контрольная проба инкубировалась только в растворе Хенкса; в опытные пробы добавляли бетулин или арабиногалактан в концентрации 6 мг/мл. Культивирование полученных клеток проводили в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч.

Размеры асцитных клеток и уровень клеток в состоянии некроза оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Olimpus. Уровень АФК, $[Na^+]_{in}$, $[K^+]_{in}$ и пролиферации оценивали с помощью флуоресцентных зондов SBFI, PBFI, 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетата FarRed на проточном цитофлуориметре Becton Culture FC500.

Результаты исследования :

В контрольной пробе не детектировалась популяция клеток, имеющая высокий уровень флуоресценции, при этом увеличивалась популяция клеток, имеющая низкий уровень флуоресценции. Это свидетельствовало о высоком уровне пролиферации. Бетулин препятствовал пролиферации, т.к. пик флуоресценции не изменялся. В образце с арабиногалактаном за сутки наблюдали одну генерацию клеток, увеличилась популяция клеток с меньшей степенью флуоресценции, но по сравнению с контролем эти изменения были выражены в меньшей степени. Таким образом, оба препарата обладали ярко выраженным антипролиферативным эффектом, причем бетулин - в большей степени.

Для исследования механизма действия бетулина и арабиногалактана на АКЭ определили основные физико-химические параметры клеток (размеры клеток и уровень в них АФК, натрия и калия).

Активные формы кислорода (АФК) играют важнейшую роль во многих внутриклеточных процессах. В небольшом количестве они необходимы для нормального функционирования многих сигнальных систем клетки, однако

избыточное образование АФК приводит к повреждению клеточных липидов, ДНК и белков. Содержание АФК в клетках определяли с помощью зонда 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетата.

Распределение асцитных клеток по уровню в них АФК показало, что в популяции асцитных клеток наблюдаются 3 группы клеток с разным уровнем АФК. Арабиногалактан практически не изменял это распределение, в то время как бетулин обладал ярко выраженным антиоксидантным эффектом.

РОЛЬ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ CodY В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ

Bacillus Intermedius

Сибгатуллина Э.Э.

*Казанский Приволжский Федеральный Университет, биолого-почвенный
факультет, Казань, Россия
E-mail: elvira0510@rambler.ru*

Одним из глобальных белков, участвующих в регуляции метаболизма и адаптации бактерий к неблагоприятным условиям, является фактор транскрипции CodY. Этот белок в клетках *B. subtilis* регулирует экспрессию около ста генов, которые вовлечены в ответ на голодание. CodY – это ГТФ-связывающий белок, который чувствителен к внутриклеточной концентрации ГТФ и регулирует транскрипцию генов в постэкспоненциальный период роста бактерий, позволяя клеткам адаптироваться к недостатку питательных средств.

Металлопротеиназы – семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Игрют роль в ремоделировании тканей, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей. Задействованы в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов, а также в активации и деактивации хемокинов и цитокинов. Металлоэндопептидазы секретируются многими бациллами. Представляло интерес изучить влияние различных регуляторных систем на экспрессию генов металлопротеиназ у бацилл.

Цель работы – установление роли глобального белка CodY в экспрессии гена металлопротеиназы mprBi *Bacillus intermedius* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*.

Материалы и методы: В работе использовали плазмиду pSA1, несущую ген металлопротеиназы *Bacillus intermedius* mprBi. Экспрессию гена mprBi изучали в штамме *Bacillus subtilis* 20-36 JB, дефектном по внеклеточным протеиназам (Jang, E. Ferrari, D. Henner), а также в штамме *B. subtilis* (Δ codY, EmR) с мутацией по гену codY (A. Sonenshein, Бостон, США). Определение активности металлопротеиназы проводили на хромогенном субстрате азоказеине. Анализ последовательности фрагмента ДНК *B. intermedius* проводили с использованием алгоритма BLAST: пакета программ, представленных на сервере NCBI. Поиск иницирующих кодонов и сайтов связывания ДНК с регуляторными белками проводили с помощью программы программы Vector NTI Suite 8.0 и ORF Finder.

Результаты: В промоторе гена металлопротеиназы *mprBi* идентифицированы потенциальные сайты регуляции для взаимодействия с белком CodY и сайты их расположения. Гомология узнаваемых CodY последовательностей составила 86% относительно консенсусной последовательности AATTTTCWGAAAATT. Эти результаты позволяют предположить участие регуляторного белка CodY в регуляции экспрессии гена металлопротеиназы на уровне транскрипции. Было показано, что максимум активности фермента в культуральной жидкости штамма *B.subtilis* ($\Delta codY$, *pSA1*), дефектного по регуляторному белку CodY, наблюдается на 24-30-й час, что соответствует стационарной фазе роста культуры, однако уровень экспрессии гена металлопротеиназы оказался ниже в 1.5 раза относительно контроля *B.subtilis* (*pSA1*) в фазу вегетативного роста.

Полученные данные позволили предположить участие регуляторного белка CodY в контроле экспрессии гена фермента металлопротеиназы в период вегетативного роста.

УСЛОВИЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ КОЭВОЛЮЦИОННОГО СИМПАТРИЧЕСКОГО ВИДООБРАЗОВАНИЯ В ТОЧЕЧНОЙ МОДЕЛИ ЭКОСИСТЕМЫ

Волкова А. Г., Барцев С. И.

*Сибирский федеральный университет, 660062, г. Красноярск, пр-т
Свободный, 79, Российская Федерация
Inger@xaker.ru*

Вопрос о механизмах образования новых видов — ключевая проблема эволюционной биологии. Однако механизмы этого процесса до сих пор не ясны. Основная сложность в понимании их заключается в невозможности провести эмпирическое исследование, так как время, необходимое для возникновения нового вида, гораздо больше, чем то, которым располагает исследователь.

Цель работы - изучить условия осуществления коэволюционного симпатрического видообразования, то есть возникновения видов в отсутствие географической изоляции. При этом учитывается изменение экосистемы в ответ на мутационные изменения одного из видов, что приводит к формированию дополнительных экологических ниш.

В основе работы лежит предположение, что выбор особями одной популяции разных жизненных стратегий может привести к образованию нового вида в условиях пространственной однородности. Под жизненной стратегией понимается совокупность жизненно важных свойств, развитых в разной степени. В этой работе жизненная стратегия представлена разным развитием двух свойств скорости роста и так называемой привлекательности жертвы для хищника. Предполагается, что эти свойства нелинейно зависят от одного фенотипического параметра (это могут быть толщина защитного панциря, длина хвоста, яркость окраски и др.). Например, особь, имеющая яркую окраску, быстрее найдет партнера, но будет и более заметной для хищника. Меняя окраску на более приглушённую, она уменьшает скорость роста, но и не привлекает внимание хищников. На этом простом примере видно, что имеются как минимум две оптимальных жизненных стратегии.

Материалы и методы: Мутационный процесс моделировался путем генерации экземпляров организмов со случайными отклонениями в величинах параметра $f(\alpha)$ – скорости роста. Для системы, состоящей из одной жертвы и хищника, система уравнений, описывающих динамику популяций, имеет вид:

$$\begin{aligned} \frac{dX_i}{dt} &= \left[f_i(\alpha) \cdot (A_0 - \sum_i X_i - \sum_j Y_j) - g_i(\alpha) \cdot \frac{\sum_j V_j Y_j}{K_m + X_i} - h_i(\alpha) k d_1 \right] X_i \\ \frac{dY_j}{dt} &= \left[\frac{\sum_i g_i(\alpha) X_i Y_j}{K_m + \sum_i X_i} - k d_2 \right] \cdot Y_j \end{aligned} \quad (1)$$

где α – фенотипический параметр, $g(\alpha)$ – привлекательность жертвы для хищника, kd – константа отмирания.

Вычисление численности популяции осуществляется методом Эйлера.

Результаты: В работе показано, что в этом случае кривая зависимости коэффициента размножения вида от развитости фенотипического параметра может иметь два максимума (рис. 1). Каждый из таких максимумов соответствует отдельной жизненной стратегии.

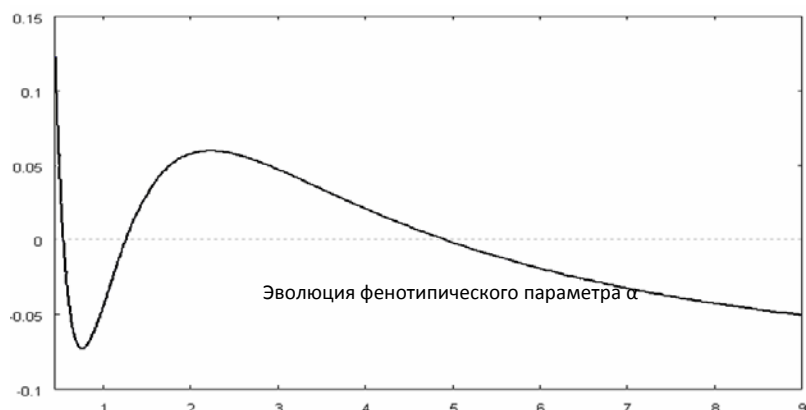


Рис.1 Кривая производной коэффициента размножения жертвы

На графике (рис. 1) изображена кривая, полученная для одного из нескольких возможных видов нелинейной зависимости коэффициентов f , g и h от фенотипического параметра α .

В работе приведены полученные кривые для других видов нелинейностей, проанализированы изменения в конфигурации данных кривых при варьировании существенных параметров (A_0 , kd , V_j); а также приведены результаты непосредственно вычислительного эксперимента: показано расщепление заданного вида на два, со значениями $f(\alpha)$ и $g(\alpha)$ отличными от исходных. Рассмотрены также возможность и условия перехода от одной жизненной стратегии к другой путём варьирования значений различных характеристик системы и построения семейств кривых.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА

Сайфуллина Д.В., Шахмаева И.И., Бондарь О.В., Абдуллин Т.И.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань ул.
Кремлевская 18, Россия
saifudivit@gmail.com*

Цитоплазматическая мембрана животных клеток представляет собой сложную функциональную структуру, образованную липидами, белками и их гликоконъюгатами. Важной характеристикой мембран клеток является их поверхностный заряд, зависящий как от биохимического состава мембранных компонентов, так и трансмембранного потенциала. Перспективным методом анализа поверхностного заряда клеток является динамическое светорассеяние. Этот метод находит широкое применение в микробиологических исследованиях [1]. Вместе с тем, актуальным представляется создание на его основе способов характеристики состояния цитоплазматической мембраны клеток животных и человека, что представляет интерес для клеточных биотехнологий и медицинской диагностики.

Цель работы - проведение анализа поверхностного заряда клеток человека в норме и при индукции апоптоза методом динамического светорассеяния.

Материалы и методы: использовали анализатор динамического светорассеяния Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). Объектами исследования служили эритроциты человека и опухолевые культуры HeLa и MCF-7. Апоптоз клеток индуцировали путем добавления 2 мМ дексаметазона в суспензию клеток в ФСБ.

Полученные результаты: установлено, что при pH 7.0 клетки HeLa, MCF-7 и эритроциты имеют отрицательный дзета-потенциал, который составляет -19.4 ± 0.8 , -20.9 ± 0.4 и -31.8 ± 1.1 мВ соответственно. Подобный отрицательный заряд клеток, вероятно, обусловлен присутствием фосфолипидов в составе цитоплазматической мембраны клеток. Более высокое значение дзета-потенциала эритроцитов – почти на 10 мВ по сравнению с культивируемыми клетками – можно объяснить наличием большого количества остатков сиаловой кислоты на поверхности эритроцитов [2].

Установлено, что на ранних стадиях индукции апоптоза в клетках MCF-7 и HeLa происходит увеличение величины отрицательного дзета-потенциала. Это увеличение можно объяснить повышением при апоптозе содержания на внешнем липидном слое клеток фосфатидилсерина, имеющего большую плотность отрицательного заряда, чем фосфатидилхолин. Результаты свидетельствуют о перспективности применения метода динамического светорассеяния для анализа поверхностной структуры клеток человека и оценки их состояния в различных условиях.

1. Wilson, W. W. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements / W. W. Wilson , M. M. Wade , S. C. Holman , F. R. Champlin // J. of Microbiol. Meth. – 2001. – № 43. – P.153–164.

2. Eylar, E.H. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte / E.H. Eylar, M.A. Madoff, O.V. Brody, J.L. Oncley // J Biol Chem. –1962. –V. 237. – №. 6. – P. 1992-2000.

ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ

Сайфуллина Д.В., Шахмаева И.И., Абдуллин Т.И.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань ул.
Кремлевская 18, Россия
saifudivit@gmail.com*

Актуальной задачей для клеточных биотехнологий является разработка и применение инструментов/методов для экспресс-оценки состояния клеток животных и человека. Ценную информацию об энергетическом статусе клеток, их жизнеспособности и метаболической активности может дать анализ метаболитов в клетках [1]. Для решения этой задачи перспективно использовать электрохимические сенсоры, отличающиеся высокой селективностью, чувствительностью и надежностью.

Цель работы- разработка эффективного инструмента для быстрой оценки состояния животных клеток по уровню их метаболической активности с помощью электрохимических сенсоров.

Материалы и методы: для создания сенсора использовали модифицированный углеродными нанотрубками электрод (МЭ), адсорбирующий клеточные метаболиты. Объектами исследования служили культура клеток HeLa, клетки крови человека (эритроциты и мононуклеары) и препараты метаболитов (аскорбиновая кислота, глутатион, НАДН, АТФ, ГТФ, серотонин, цистеин и др.). Для ингибирования метаболизма в клетках индуцировали апоптоз под действием дексаметазона. Клетки обрабатывали дексаметазоном в двух концентрациях: нетоксичной (0,1 мМ) и вызывающей ингибирование роста клеток на 50 % (1,0 мМ) по данным MTS-теста.

Полученные результаты: установлено, что клетки разных типов обладают электрохимической активностью и генерируют на МЭ один (эритроциты), два (HeLa) или три пика (мононуклеары) при потенциалах +0,8; +1,1 и +1,2 В соответственно. Электрохимический сигнал клеток обусловлен окислением метаболитов, выделяемых из жизнеспособных клеток и адсорбирующихся на МЭ. Экспериментально установлено, что сигнал клеток обусловлен следующими группами метаболитов: глутатион, аминокислоты/белки (пик 1), гуаниновые нуклеотиды, включая ГТФ (пик 2); адениновые нуклеотиды, включая АТФ (пик 3).

В нетоксичной для клеток концентрации дексаметазон вызывал повышение пиков 1 и 3, вероятно, вследствие индукции синтетических процессов в клетках [2]. В концентрации 1,0 мМ дексаметазон подавляет метаболическую активность клеток, что выражается в существенном уменьшении пиков 1 и 3, очевидно вследствие индукции апоптоза, который сопровождается ингибированием синтеза АТФ и других метаболитов [3,4]. Результаты свидетельствуют о возможности использования электрохимических сенсоров на основе углеродных нанотрубок для анализа метаболитов клеток с целью диагностики их состояния клеток, в частности, жизнеспособности и запуска апоптоза, уровня окислительного стресса в норме, при патологии и при действии лекарственных средств. В настоящее время разработанные сенсоры адаптируются к формату одноразовых печатных электродов, характеризующихся низкой себестоимостью и простой использования.

Литература:

1. Вельков, В.В. «Многомерная биология XXI века и Клиническая лабораторная диагностика» / В.В. Вельков [Электронный ресурс] // ж. «Химия и Жизнь». – 2007. – № 3. – С. 10-15. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=2715>.
2. Chauhan, D. Cytochrome c-dependent and -independent Induction of apoptosis in multiple myeloma cells / D. Chauhan, P. Pandey, A. Ogata, G. Teoh, N. Krett, R. Halgren, S. Rosen, D. Kufe, S. Kharbanda, K. Anderson // The Journal of Biological Chemistry. – 1997. – V.272. – P.29995-29997.
3. Sharma, S. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors / S. Sharma, A. Lichtenstein // BLOOD. – 2008. – May 30. – V.112. – № 4. – P. 1338-1345.
4. Skulachev, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell / V. P. Skulachev // FEBS Lett. – 1996. – V.397. – № 1. – P. 7-10.

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА КЛЕТКАМИ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ Сумарокова М.В.

Сибирский федеральный университет, кафедра биофизики ИФБиТ
mashastudik@mail.ru

Взаимодействию электромагнитного излучения и биологических объектов, в том числе красной крови, посвящена обширная литература. Однако сравнительно мало экспериментальных исследований о возбуждении иного типа волн – электроакустических, теоретически предсказанных отечественными исследователями в последней трети 20 века.

Цель работы – исследование влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на образцы крови человека

Результаты: Воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 514 и 465 нм в дозе 6-6,5 мДж *in vitro* выявило специфичность изменения кинетики генерации активных форм кислорода (АФК) клетками в цельной крови при антигенной активации (и без нее) для образцов с нормо- и гипопродуктивным типом генерации АФК, регистрируемой хемилюминесцентным методом. Для кинетики продукции люминолзависимых АФК (H_2O_2 , OH^- , HClO^-) при антигенной активации клеток *in vitro* характерно снижение на 9-17 % максимальной интенсивности и объема продукции АФК и сокращение на 9-17 мин времени достижения максимума респираторного взрыва в образцах крови обоих типов. Изменение хемилюминесцентной кинетики спонтанной (без антигенной активации) продукции люминолзависимых АФК более ярко выражено в образцах с нормопродуктивным типом и проявляется в 2-кратном увеличении максимальной интенсивности и объема продукции и сокращении времени достижения максимума на 40 минут по сравнению с контролем. Изменение кинетики продукции люцигенинзависимых АФК (O_2^-), более выраженное при облучении $\lambda=514$ нм, проявляется в активации спонтанной продукции, о чем свидетельствует увеличение значений максимальной интенсивности и объема продукции АФК на 35 % на фоне некоторого снижения интенсивности респираторного взрыва при антигенной активации в образцах гипопродуктивного типа. Кинетика генерации люцигенинзависимых АФК в образцах нормопродуктивного типа изменялась в

сторону увеличения значения максимума люминесцентной кривой антигенактивированного респираторного взрыва и сокращения времени его достижения после облучения светом с $\lambda=465$ нм.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ответной реакции кислородного метаболизма клеток крови на воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 514 и 465 нм. Изменения кислородного метаболизма клетки могут приводить к каскаду биохимических событий и в конечном итоге - к нарушению нормального функционирования клеток.

ХАРАКТЕРИСТИКИ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СВЕЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ NADH:FMN-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА В ЖЕЛАТИНЕ

Безруких А.Е.¹, Есимбекова Е.Н.²

¹Сибирский федеральный университет, пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия; ²Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, 660036, Россия

e-mail: aebezrukih@gmail.com

Биферментная система светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза используется для разработки специфических методов анализа различных метаболитов и активности ферментов, а также является тест-объектом для определения интегральной токсичности различных сред. Кроме того, бактериальная биолюминесцентная система благодаря удобству регистрации ферментативной активности может стать основой для экспериментального моделирования функционирования ферментов внутри клетки путём подбора соответствующего вязкого микроокружения. При этом существует проблема быстрой инактивации биферментной системы при воздействии неблагоприятных факторов (температуры, pH). Одним из основных способов получения стабильных и удобных в использовании ферментных препаратов является иммобилизация ферментов в различных средах.

Цель данной работы - изучение характеристики ферментов светящихся бактерий, помещённых в вязкое микроокружение желатина, а также получить иммобилизованный реагент путём включения биферментной системы в желатиновый гель.

Материалы и методы: Исследована активность биферментной системы, включающей в себя люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*P. leiognathi*) и NADH:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri*, в присутствии желатина разных концентраций (0.5%, 1%, 1.5%, 5%) в диапазоне температур от 10 до 50°C. Была изучена термоинактивация биферментной системы, при этом ферменты инкубировали в течение 0,5-30 минут при разных температурах в интервале от 10 до 50°C в 0,5%, 1% и 5% растворах желатина.

Результаты: Показано, что активность биферментной системы и кинетика её термоинактивации в желатине, не образующем гель, (золе) и в гелеобразном желатине различаются. В то время как помещение ферментов в золь желатина приводит к снижению интенсивности биолюминесценции, включение ферментов в гелевую матрицу желатина способствует их стабилизации и увеличению выхода активности. Было выявлено, что термоинактивация биферментной системы имеет нелинейный характер и протекает по диссоциативному механизму. Также показано, что желатин в виде

золя ускоряет первый этап термоинактивации, а гелеобразный желатин, напротив, способствует активации биферментной системы.

Также на основе ферментов светящихся бактерий был получен иммобилизованный реагент путём включения ферментов в желатиновый гель с последующей процедурой высушивания. Данный реагент обладает хорошей стабильностью в процессе хранения: в течение 2 месяцев ферментативная активность иммобилизованного реагента не изменяется. При этом интенсивность свечения иммобилизованного реагента сопоставима с интенсивностью свечения эквивалентного количества растворимой биферментной системы.

**ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ
БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ НАДН:ФМН-
ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА В РАСТВОРАХ
ПОВЫШЕННОЙ ВЯЗКОСТИ**
Сутормин О.С., Суковатая И.Е.

Сибирский федеральный университет
e-mail: sutormin.oleg@yandex.ru

Задачи развития физико-химических основ биolumинесцентного анализа, повышения специфичности и расширения области применения биolumинесцентного мониторинга актуальны и включают использование ферментативных систем разного уровня сложности. При создании и использовании люциферазных биотестов в различных областях биотехнологии приходится иметь дело с проблемой нестабильности белков сопряженной ферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люциферазы вообще, и их термостабильности, в частности. Исследование механизмов бактериальной биolumинесценции посредством подбора условий для увеличения термостабильности биolumинесцентной биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в растворах повышенной вязкости позволяет установить связь биolumинесценции с другими метаболическими процессами клетки, а также исследовать регуляцию светоизлучения. Отличительной особенностью сопряженной ферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза является возможность регистрации квантов света, которая может быть способом оценки при анализе и апробации смоделированной экспериментальной модели.

Цель работы - подбор условий для увеличения термостабильности биolumинесцентной биферментной системы NAD(P)H:FMN- оксидоредуктаза-люцифераза в растворах повышенной вязкости с использованием сахарозы и глицерина.

Материалы и методы: Для подбора условий ведущих к увеличению термостабильности биolumинесцентной биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в растворах повышенной вязкости с использованием сахарозы и глицерина использовали следующий диапазон температур - от 20° С до 45 ° С. Биolumинесцентная биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в буферном растворе и в растворах повышенной вязкости с использованием как сахарозы, так и глицерина инкубировалась на водяной бане в течение и 5 мин. В ходе биферментной биolumинесцентной реакции регистрировали следующие

кинетические параметры: интенсивность свечения, константу спада и квантовый выход.

Результаты: Полученные результаты показали, что увеличение вязкости реакционной среды, путем увеличения добавляемых концентраций глицерина и сахарозы, приводит к увеличению термостабильности биферментной системы: температурный оптимум увеличивается на 10°C по сравнению с контролем и наблюдается при близких значениях вязкости реакционной среды, моделируемой разными по природе растворителями (глицерином и сахарозой) (рис.1). Кроме того, температурные профили, полученные в экспериментальных моделях с близкими значениями вязкости реакционной среды для ферментативного катализа, идентичны и отличаются значениями остаточной интенсивности, а значит, зависят главным образом от вязкости реакционной среды. Остаточная интенсивность свечения биферментной системы определяется не только вязкостью реакционной среды, но и природой растворителя, так как в экспериментальной модели с сахарозой интенсивность свечения биферментной системы на 20% выше, чем в глицерине при всех исследуемых температурах в диапазоне от 25°C до 45°C.

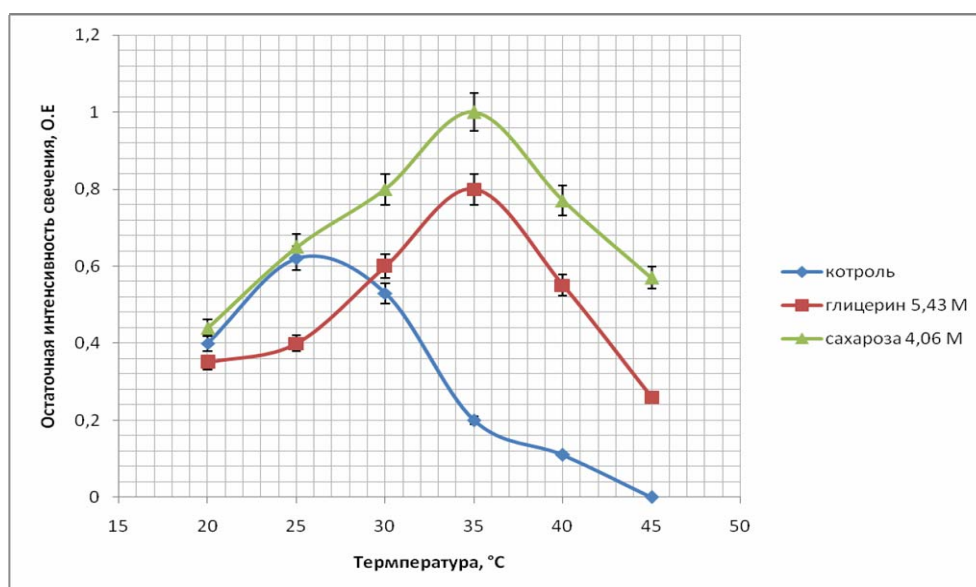


Рисунок 1- Оптимум температур биферментной бактериальной биолюминесцентной системы в 5,43М глицерине (вязкость 6,05 мПа•с) и 4,06М сахарозе (вязкость 7,2 мПа•с)

Определение графическим способом значений энергии активации изучаемых экспериментальных моделей показало, что в присутствии сахарозы наблюдается увеличение энергии активации относительно контрольного значения, а в присутствии глицерина значение энергии активации уменьшалось относительно контроля. Следовательно, для термоинактивации биферментной сопряженной системы в сахарозе требуются дополнительные затраты энергии. Таким образом, величина энергии активации зависит не только от вязкости реакционной среды, но и от природы растворителя. Сахароза является эффективным проектантом биферментной бактериальной биолюминесцентной системы.

Литература:

1. Serdakowski, A Enzyme activation for organic solvents made easy / A.L Serdakowski, J.S Dordick // TRENDS in Biotechnology – 2007. № 1- P 48-54

2. Doukyu, N Organic solvent-tolerant enzymes / N. Doukyu, H. Ogino // Biochemical engineering journal – 2010. №48- P 270-282
3. Варфоломеев, С.Д Химическая энзимология [Текст]: учеб / С.Д Варфоломеев. – М.: Академия, 2005. – 480 с.
4. Campbell, Z.T Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit / Z.T. Campbell, A. Weichsel, W.R. Montfort, T.O. Baldwin // Biochemistry – 2009. № 48 – P 6085–6094
5. Mehrabi, M Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes / M Mehrabia, S Hosseinkhania,, S Ghobadi // International Journal of Biological Macromolecules – 2008. № 43 – P 187–191.

Работа выполнена при поддержке грантов:

- грант № 2.2.2.2/5309 Министерства образования и науки РФ, Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы», проект «Моделирование процессов функционирования сопряженных ферментативных систем в клетке на примере ферментов светящихся бактерий», 2009-2011;
- грант ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы», проект «Биolumинесцентный анализ молекулярных процессов в клетках и их физико-химических моделях; создание на их основе нового поколения биolumинесцентных сенсоров для биологии и медицины», контракт № 02.740.11.0766.

ОЦЕНКА ОСТАТОЧНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЕССОЛЕННОЙ НЕФТИ С ПОМОЩЬЮ БИФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ FMN:NADH-ОКСИДОРЕДУКТАЗА-ЛЮЦИФЕРАЗА

Лукьяненко К.А.

*Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
e-mail: kirill.lukyanenko@gmail.com*

Человек с древних времен использует нефть в промышленности и в быту. Но не стоит забывать, что это полезное ископаемое может также быть очень токсичным для окружающей среды. Вследствие этого необходимо своевременно и точно определять концентрации токсинов, сопутствующих нефти, в воде и почвах в местах добычи и при экологических катастрофах. Одним из способов мониторинга состояния окружающей среды является применение методов биотестирования.

В последнее время большое распространение приобрели приборы, сделанные по принципу «lab-on-a-chip» [1] или микрофлюидные аналитические системы, совмещающие в плоском устройстве сантиметровых размеров смешивание реагентов и проведение химической реакции. Предлагается применять в качестве биологического модуля в этих приборах биферментную люминесцентную систему NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза (КРАБ (комплект реактивов для аналитической биохимии Институт биофизики СО РАН)), который доказал свою эффективность [2-4].

Цель работы - разработка методики по использованию биolumинесцентных систем в лабчипах для анализа проб на загрязненность токсинами, сопутствующими нефти.

Материалы и методы: Для оценки эффективности применимости этой системы произведен опыт по определению уровня токсичности обессоленной нефти. Обессоленную нефть, предоставленную Институтом нефти и газа СФУ,

разбавили в пробирке с дистиллированной водой, затем в течение пяти минут происходило перемешивание смеси. После этого в течение получаса проба отстаивалась. Воду, оставшуюся на дне с растворимыми нефтепродуктами, отобрали и добавили в пробу с реакционной смесью биферментной системы. Затем пробу поместили в люменометр и измерили кинетику реакции. Состав реакционной смеси буфера для биферментной системы был следующим: 200 мл буферного раствора (0,05 моль/л), 0,5 мл КРАБ ($1,28 \times 10^{-7}$ моль/л), 1 мл С14 (0,0025%), 4 мл NADH (6×10^{-5} моль/л), 1 мл FMN ($6,25 \times 10^{-5}$ моль/л). Состав реакционной смеси для пробы с загрязненной нефтью водой: 200 мл дистиллированной воды, смешанной с нефтью, 0,5 мл КРАБ, 1 мл С14 (0,0025%), 4 мл NADH (6×10^{-5} моль/л), 1 мл FMN ($6,25 \times 10^{-5}$ моль/л).

Результаты показали, что разница средней максимальной интенсивности контроля и модельной загрязненной пробы составила менее 1 % при погрешности измерений 10 %. Было показано, что обессоленная нефть не содержит в своем составе водорастворимых токсинов, что и ожидалось обнаружить при качественной очистке. Обладает ли биферментная система достаточной чувствительностью для определения токсичности водной пробы, загрязненной не обессоленной нефтью, планируется выяснить в последующих экспериментах.

Небольшая стоимость реагентов системы FMN:NADH-оксидоредуктаза-люцифераза делает ее выгодной для массового производства биотестов, которые будут качественно отличаться от конкурентов. Препятствием в реализации данного метода является необходимость создания точной измерительной системы и методов математической обработки результатов измерения.

Ведется разработка методов для математической обработки результатов. В качестве среды разработки используется Blackbox Component Builder. Для математической обработки принято решение использовать генетический алгоритм, который широко применяется для решения задач на оптимизацию функции [5-7].

Литература:

- 1) В.Г. Беленький, Н.И. Комяк, В.Е. Курочкин, А.А. Евстапов, В.Л. Суханов / Микрофлюидные аналитические системы. Часть I./ Научное приборостроение. – 2000. – Т.10, №2.
- 2) Экологическая биофизика. Учебное пособие: В 3 т. Под ред. И.И. Гительзона, Н.С. Печуркина. Том 1. Фотобиофизика экосистем / М.: Изд-во Логос, 2002. – 360 С.
- 3) Торгашина И.Г. Исследование чувствительности иммобилизованного ферментативного реагента для экологических биOLUMИНЕСЦЕНТНЫХ тестов: Диссертация на соискание степени к.б.н. – Красноярск, 2007.
- 4) Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichuk E.B., Kuznetsov A.M. & Ivanova E.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / Chemosphere, 2001. 42: Pp. 909-915.
- 5) Mitchell A. Potter and Kenneth A. De Jong. A cooperative coevolutionary approach to function optimization / Lecture Notes in Computer Science, 1994, Volume 866/1994, 249-257.
- 6) Isao Ono, Shigonobu Kobayashi. A Real-coded Genetic Algorithm for Function Optimization Using Unimodal Normal Distribution Crossover / Proceedings of the Seventh International Conference on Genetic Algorithms ICGA97 (1997) Volume: 14, Issue: 6, Publisher: Morgan Kaufmann, Pages: 246-253
- 7) Christopher R. Houck, Jeffery A. Joines, Michael G. Kay. A genetic algorithm for function optimization: a matlab implementation / NCSU-IE TR, 1995

ОСОБЕННОСТИ ЗАМЕДЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ КУЛЬТУР ЗЕЛЕНых, СИНЕ-ЗЕЛЕНых И ДИАТОМОВых МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Т.Н. Ларина

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

Одним из важнейших компонентов водных экосистем, определяющих особенности их функционирования и формирующих, в итоге, качество воды, является фитопланктон. Изучение физиологического состояния фитопланктонных сообществ является одной из важнейших задач экологии. Измеряя флуоресценцию фитопланктона, можно рассчитать концентрацию хлорофилла у микроводорослей трех основных таксонов: сине-зеленых, диатомовых и зеленых, обладающих различиями пигментного аппарата и спектров возбуждения флуоресценции.

Не смотря на широкое использование флуоресцентного подхода для изучения состава и функционирования фитопланктона, метод имеет ряд ограничений. Достоверное разделение фитопланктона возможно лишь на несколько нетаксономических групп, по основным флуоресцентным пигментам – хлорофилл «а», «b» для зеленых водорослей, хлорофилл «а», «с» - для диатомовых, хлорофилл и фикобилины - для сине-зеленых. В большинстве же случаев водоросли разных видов в составе одного отдела обладают сходными флуоресцентными характеристиками. Развитие методов регистрации флуоресценции, повышение чувствительности и разрешающей способности, современных флуориметров позволяют нам отыскать индивидуальные флуоресцентные «почерки» отдельных видов водорослей и групп фитопланктона.

Исследование флуоресцентных характеристик лабораторных культур зеленых, сине - зеленых и диатомовых микроводорослей показало, что с помощью современных флуориметров, при использовании режима time-resolved mode (временное разрешение), возможно четкое разделение зелёных и сине-зелёных водорослей в смеси в условиях природного фитопланктона. По результатам собственных исследований были получены трёхмерные изображения полей флуоресценции зеленых, сине - зеленых и диатомовых водорослей, уточняющие локализацию пиков флуоресценции живых культур. А также была найдена максимальная чувствительность регистрации флуоресцентного сигнала как для зеленых, так и для сине - зеленых водорослей.

Обнаружен различный характер флуоресценции зеленых и сине-зеленых водорослей в режиме интегрирования сигнала с задержкой в 50мкс. Увеличение времени интегрирования сигнала приводило к повышению чистой (за вычетом фона) флуоресценции у зеленых водорослей и не изменялось в случае с сине - зелеными.



СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
SIBERIAN FEDERAL UNIVERSITY



ИБФ СО РАН

РАЗДЕЛ 3

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА

ТЕХНОГЕННЫЕ РАДИОНУКЛИДЫ В БАССЕЙНЕ РЕКИ ЕНИСЕЙ

Болсуновский А.Я., Дементьев Д.В.

Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск, Россия
e.mail: radecol@ibp.ru

Река Енисей является одной из крупнейших рек мира. Техногенные радионуклиды поступают в бассейн реки Енисей в результате глобальных выпадений, а также технологических сбросов предприятий ядерного топливного цикла Росатома. Наиболее существенное влияние на экосистему реки оказывает Горно-химический комбинат (ГХК), который расположен в 60 км от города Красноярск на берегу реки в г. Железногорске. Более чем 50-летняя деятельность реакторного и радиохимического заводов ГХК привела к радиоактивному загрязнению поймы реки Енисей. Специалисты Росатома в своих публикациях и выступлениях утверждают, что на ГХК ранее отсутствовали аварийные ситуации и поэтому существующий уровень радиоактивного загрязнения реки минимальный по сравнению с другими водоемами вблизи которых расположены аналогичные предприятия. Однако проведенные научные экспедиции специалистов Института биофизики СО РАН и Института геологии и минералогии СО РАН в рамках интеграционных проектов СО РАН выявили ряд фактов, свидетельствующих о многократном превышении над фоном содержания радионуклидов в экосистеме реки Енисей. Были обнаружены участки поймы реки с аномальным уровнем ^{137}Cs и трансурановых элементов (^{238}Pu , $^{239,240}\text{Pu}$, ^{241}Am), содержание которых в 100 и более раз превышает глобальный уровень. Как правило, это локальные пятна, но обнаружена и протяженная аномалия в береговой зоне города Енисейска на расстоянии 330 км от ГХК.

В 1994-1995 годах впервые в пойме Енисея были обнаружены «горячие» высокоактивные частицы с содержанием ^{137}Cs до 30 МБк/частицу. Лабораторные исследования доказали реакторное происхождение этих частиц (реакторы ГХК) и позволили определить ориентировочный возраст их образования. Ранее в поймах рек Теча и Томь, вблизи работы других плутониевых комплексов, не были обнаружены такие высокоактивные частицы, как на Енисее. Мониторинг содержания радионуклидов в пробах гидробионтов (водные растения, зообентос, рыба) реки Енисей в районе размещения ГХК выявил широкий спектр долгоживущих и короткоживущих техногенных радионуклидов, включая трансурановые элементы. Для разных видов было зарегистрировано до 30 техногенных радионуклидов, среди которых максимальное накопление гидробионтами отмечено для ^{32}P . Впервые проведенный детальный анализ загрязнения радионуклидами компонентов лесных экосистем в пойме реки выявил факт аномального содержания ^{137}Cs до 10200 Бк/кг в грибах *Suillus granulatus* и *Suillus luteus*, что превышает установленный российскими нормативами предел (2500 Бк/кг). Виды ягодных кустарников *Ribes nigrum* и *Rubus idaeus* характеризуются повышенным накоплением радионуклидов по сравнению с другими видами. Многолетние измерения проб кустарников с пойменных почв регистрировали такие техногенные радионуклиды как ^{137}Cs , ^{60}Co , ^{90}Sr , трансурановые элементы (^{238}Pu , $^{239,240}\text{Pu}$, ^{241}Am , $^{243,244}\text{Cm}$), а также ^{238}U .

Рассчитаны дозы облучения разных видов гидробионтов. Кроме дозовой нагрузки, оценивали частоту хромосомных нарушений в пробах водных растений *Elodea canadensis* и *Batrachium kauffmannii*, собранных в разных районах реки Енисей. Исследования показали, что в контрольных районах вне

зоны радиоактивного загрязнения доля хромосомных нарушений не превышает 4-10%, в пробах из районов радиоактивного загрязнения суммарная частота хромосомных мутаций в ана-телофазах и метафазах составляет довольно высокий процент (до 35 %).

Полученные данные свидетельствуют, что за 50-летнюю деятельность на комбинате имели место нештатные ситуации, сопровождающиеся выносом техногенных радионуклидов в виде высокоактивных частиц и поступлением радиоактивных отходов в экосистему реки Енисей.

ПОЧВЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ - БИОДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Прудникова С.В.

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, пр. Свободный, 79,
e-mail: sprudnikova@sfu-kras.ru*

Полигидроксиалканоаты (ПГА) принадлежат к семейству полиэфиров микробиологического происхождения и синтезируются многими бактериями как внутриклеточное запасное органическое вещество. В то же время эти соединения подвержены биодеструкции со стороны микроорганизмов, выделяющих специфические внеклеточные гидролазы. Применение биоразрушаемых полимеров позволяет снизить загрязнение окружающей среды и истощение запаса не возобновляемых ресурсов. По этой причине сфера применения биополимеров расширяется, и все большую актуальность приобретает исследование процесса их деградации в природных условиях.

Известно, что ПГА разрушаются различными группами микроорганизмов – бактериями, актиномицетами, грибами.

Цель работы - выделение микроскопических почвенных грибов, осуществляющих деструкцию полигидроксибутирата (ПГБ) в природных условиях.

Материалы и методы: Полимер был синтезирован бактерией *Wautersia eutropha* B5786 по технологии, разработанной в ИБФ СО РАН. Из полимерного материала изготавливали плёнки методом полива из раствора ПГА в хлороформе. Предварительно взвешенные образцы ПГБ в виде плёночных дисков массой 60 ± 6.5 мг (диаметр 30 мм, толщина 80 ± 7 мкм) размещали в сетчатых нейлоновых контейнерах в верхнем слое почвы прикорневой зоны древесных растений (*Larix sibirica* L. и *Betula pendula* L.), растущих в дендрарии Института леса СО РАН. Образцы экспонировали в течение 3-х месяцев (июль-сентябрь), затем с поверхности плёнок делали соскоб почвы и высевали на питательную среду в чашки Петри. Для выделения ПГА-деградирующих микроорганизмов использовали метод, основанный на обнаружении прозрачных зон, формирующихся вокруг колоний микроорганизмов при высеве на минеральный агар, содержащий в качестве единственного источника углерода порошкообразный полимер (ПГБ).

Результаты: Идентифицированы микромицеты в исходных пробах контрольной почвы в прикорневой зоне лиственницы и установлено доминирование представителей рода *Penicillium* (74,6 %), также обнаружены *Verticillium* (18,2 %), *Acremonium* (1,8 %) и *Mucor* (5,5 %). В прикорневой зоне

берёзы выявлено большее разнообразие видов; помимо представителей родов *Penicillium* и *Verticillium* (15,0 %), идентифицированы *Beltrania*, *Cladosporium* (1,7 %), *Hyphoderma* (1,7 %), *Pytium* (3,3 %), *Cephalosporium* (8,3); при этом в качестве доминирующих определены два рода – *Penicillium* (33,3 %) и *Beltrania* (31,7 %). Микробиологический анализ почвы прикорневой зоны обоих деревьев показал, что через 3 месяца в контрольных образцах почвы сохранилось преобладание грибов рода *Penicillium* (50-68 %). Среди грибов, выделенных с поверхности полимера, в ризосфере берёзы также доминировали представители рода *Penicillium*, а в ризосфере лиственницы представители рода *Paecilomyces*, численность которых составила 81 и 81,5 %, соответственно.

Исследование биодеструктивной способности у выделенных грибов показало, что не все виды обладали деполимеразной активностью в отношении ПГБ. При высеве на диагностическую среду с полимером образование прозрачных зон вокруг колоний было отмечено у представителей родов *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*. Сравнительный анализ показал, что в опытных образцах преобладали виды, обладающие деполимеразной активностью, их суммарная численность составляла до 90 % популяции микромицетов, тогда как в контрольных образцах почвы количество грибов-деструкторов составляло от 5 до 15 %.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОДЕГРАДАЦИИ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Коробихина К.И, Прудникова С.В.

*Сибирский федеральный университет. проспект Свободный 79, Россия
e-mail: bk1988@mail.ru*

Широкое использование синтетических полимеров привело к определенным негативным последствиям, наиболее очевидным из которых является загрязнение окружающей среды полимерными отходами. Масштабы ущерба причиняемого окружающей среде высоки, это связано, прежде всего, с крайне медленными скоростями естественного разложения синтетических полимеров, что приводит к накоплению их в различных природных средах. Одним из способов преодоления данной проблемы является использование полимерных материалов, способных к химической или биологической деградации до нетоксичных минеральных веществ в окружающей среде.

Перспективными полимерами данного типа являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Это группа полиэфиров, синтезируемых многими бактериями в качестве источника внутриклеточного углерода и запасаемого источника энергии. Среди эффективных деструкторов ПГА – разнообразные бактерии, относящиеся к широко распространенным почвенным и водным представителям (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Streptomyces*, *Ilyobacter*).

Цель работы - исследование почвенных микроорганизмов, осуществляющих биодеструкцию гомополимера (полигидроксипропионата, ПГБ) и сополимера (полигидроксипропионата/валерата, ПГБ/ПГВ).

Материалы и методы: Эксперимент проводили в природных условиях на территории дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск). Для этого образцы полимера в виде пленочных дисков в нейлоновых сетчатых контейнерах размещали в почве на глубине 5 см.

Результаты: Установлено, что степень деградации гомополимера (ПГБ) в почве в условиях полевого сезона 2010 г. составляла 8,6-10,1%; сополимера (ПГБ/ПГВ) - 11-16 %.

Из биопленки, сформированной на поверхности полимера, методом соскоба были взяты микробиологические пробы, которые высевали на питательную среду. Анализ показал, что численность микроорганизмов на поверхности полимера была выше, чем в контрольных образцах почвы в среднем на 67%. Так как полимер является субстратом для микроорганизмов, на нем формируются пленки обрастания, что приводит к увеличению численности микроорганизмов по сравнению с нативной почвой. Скрининг бактерий-деструкторов биополимера проводили на минеральном агаре, содержащем в качестве источника углерода порошкообразный ПГБ. Рост микроорганизмов, обладающих деполимеразной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний характерных прозрачных зон. На основании сходных морфотипов были отобраны 14 штаммов, способных к биодеструкции ПГА, которые в последующем были идентифицированы по совокупности культуральных, морфологических, биохимических и молекулярно-генетических признаков. Исследуемые штаммы относились к родам *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Xanthomonas*.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В ПОЧВАХ ВЬЕТНАМА

Бояндин А.Н.¹, Фам Тхи Тхем², Ивонин В.Н.², Филичев Н.Л.³

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;

²Головное отделение Российско-Вьетнамского Тропического Центра, Ханой, Вьетнам;

³Приморское отделение Российско-Вьетнамского Тропического Центра, Нячанг, Вьетнам
e-mail: araneus@mail.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры микробиологического происхождения. В природной среде они разрушаются ПГА-деградирующими микроорганизмами; это делает эти биополимеры важными с экологической точки зрения заменителями синтетических пластиков.

Цель работы - исследование деградации ПГА двух типов – гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты и сополимера 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот в почвах с различными климатическими характеристиками: г. Красноярск (Сибирь, Россия), г. Ханой (Вьетнам) и г. Нячанг (Вьетнам).

Материалы и методы: Образцы ПГА (гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (ПГБ) и сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (ПГБВ) синетзированы штаммом *Cupriavidus necator* ВКПМ-5786. Исследовали образцы полимеров в виде пленок и таблетированных форм на климатических испытательных станциях (КИС) Ханоя (Хоа Лак) и Нячанга (Дам

Бай) Российско-Вьетнамского тропического центра. Предварительно взвешенные образцы ПГА, упакованные в чехлы из мелкочаеистого мельничного газа, экспонировали в почве на глубине 15 см в течение 6 месяцев в период с мая по ноябрь 2010 года. Регистрировали температуру почвы, температуру и влажность воздуха, количество осадков. Периодически (1 раз в месяц) образцы изымали из почвы, очищали от остатков почвы, высушивали и взвешивали. Смывы с поверхности образцов использовали для микробиологических исследований (контроль - образцы почвы). Для выделения микроорганизмов-деструкторов ПГА использовали метод прозрачных зон с высевом проб на плотные среды, содержащие ПГА в качестве единственного источника углерода. Колонии деструкторов ПГА были окружены зонами лизиса в результате гидролиза полимера под воздействием экзодеполимераз, выделяемых микроорганизмами.

Результаты: Климатические условия в месте проведения исследований были следующими: среднемесячное количество осадков на КИС Хоа Лак (Ханой) составило 179,3 мм; в Дам Бай (Нячанге) – существенно ниже (39,2 мм). Средние температуры воздуха и почвы на станциях практически не отличались, - 29,16°C и 29,08°C для воздуха, и 27,8°C и 28,1°C для почвы соответственно; pH почвы составила на КИС Хоа Лак 5,48, на КИС Дам Бай – 6,63.

В связи с существующим предположением, что на деградацию ПГА может влиять способ переработки полимеров в изделия, проведено сравнительное изучение биodeградации изделий из ПГА в виде пленок и прессованных объемных таблеток.

Динамика уменьшения массы образцов биопластиков показала значительно более высокую скорость их разрушения на станции Ханоя (степень разрушения 36-97 % для разных типов образцов) по сравнению со станцией Нячанга (не выше 19 %), что может объясняться более низкой влажностью почвы в Нячанге в течение летних месяцев. Разрушение пленок происходило быстрее, чем разрушение таблетированных форм. Через 184 дня экспозиции в почве КИС Хоа Лак (г.Ханой) пленочные образцы из ПГБ разрушились более чем на 97 %, из ПГБВ – на 41%, в то время как для прессованных образцов – только на 50 и 36 % соответственно. В эксперименте на КИС Дам Бай разрушение пленок из ПГБ составило 16, из ПГБВ – около 7 %; таблетки ПГБ разрушились на 18, таблетки ПГВ – на 3 %. Отмечено более быстрое разрушение образцов ПГБ по сравнению с образцами ПГБВ, что, возможно, обусловлено специфичностью экзодеполимераз микроорганизмов-деструкторов.

По мере деструкции пленок происходили убыль их массы и уменьшение толщины. Наблюдалось образование небольших пор, размеры и количество которых возрастали с увеличением длительности эксперимента. С увеличением количества перфораций целостность полимерных изделий нарушалась, и они распадались на отдельные фрагменты.

Изменения внешнего состояния прессованных таблетированных форм было менее значительным по сравнению с пленочными образцами. По мере их разрушения отмечалось возникновение неровностей на поверхности, с дальнейшим их углублением и истончением образцов. Характерной особенностью деструкции в данном случае было постепенное развитие глубинных повреждений образцов, внешне выражающееся в наличии потемнений, не поддающихся механическому удалению без разрушения образца. Такая специфика деструкции может быть связана с проникновением микроорганизмов-деструкторов вглубь через дефекты-поры, образованные стыками отдельных микрогранул полимера, составлявших подвергавшийся

прессованию порошок. Изменение морфологии поверхности у образцов с сополимером ПГБВ было менее выраженным по сравнению с гомополимером ПГБ, что согласуется с данными о различиях в скоростях деградации ПГБ и ПГБВ.

В почве КИС Хоа Лак доминирующими видами микроорганизмов определены *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter artocyanus*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Brevibacillus agri*, *Brevibacillus invocatus*, *Chromobacterium violaceum*, *Cupriavidus gilardii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus haemoliticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Pseudomonas acephalitica*, *Rodococcus equi*; в почве КИС Дам Бай – *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Brevibacillus agri*, *Gordonia terrarii*, *Microbacterium paraoxydans*.

Микробиологический анализ почвы в конце периода наблюдения (184 суток) выявил стимулирующее действие ПГА на микробиоценоз почвы. Концентрация бактерий, адгезированных на поверхности полимерных образцов, составила 2×10^8 - 10^9 КОЕ/г, в то время, как в контрольной почве – 10^7 КОЕ/г. Результаты анализа грибной микрофлоры показали увеличение численности микромицетов на поверхности образцов (2×10^6 - 2×10^7 КОЕ/г для Ханоя, 7×10^4 - 10^6 КОЕ/г для Нячанга) по сравнению с контрольной почвой (8×10^4 КОЕ/г для Ханоя, 9×10^3 КОЕ/г для Нячанга). Это свидетельствует об активном участии грибов в деградации полимеров. Концентрация грибов-деструкторов ПГА на поверхности активно разрушаемых образцов увеличивалась на два порядка, а более медленно разрушаемых – на порядок по сравнению с их фоновыми концентрациями в почве.

С использованием метода прозрачных зон выделены микроорганизмы, обладающие ПГА деполимеразной активностью, количество и разнообразие которых зависело от места размещения образцов. Среди деструкторов ПГА на станции Хоа Лак выделено 16 штаммов бактерий, 16 штаммов актиномицетов и 60 штаммов грибов; на станции Дам Бай – 46 штаммов бактерий, 7 штаммов актиномицетов и 14 штаммов грибов. Идентификация этих микроорганизмов выполнена с применением, помимо традиционных микробиологических методов, секвенированием последовательностей гена 16S рПНК.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ГАММА-ФОНА В ЦЕНТРАЛЬНЫХ РАЙОНАХ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

Писарев В.С.¹, Григорьев А.И.², Чечеткин В.А.³

¹Сибирский федеральный университет, кафедра физико-химической биологии ИФБиТ, ²ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»,

³Лаборатория радиационного контроля ООО «ГеоЛа»
e.mail: Kaiafas@mail.ru

Основным параметром, характеризующим радиационную обстановку любой территории, является мощность дозы (МД) внешнего гамма-излучения (гамма-фон на открытой местности на высоте 1 м), которая, как известно, формируется за счет «земных» и «космических» компонентов. К «земному» компоненту относится излучение естественных радионуклидов (ЕРН) – ^{40}K , а также ^{238}U и ^{232}Th с дочерними продуктами их распада, присутствующих в почве

и приземном слое атмосферы. «Космический» компонент состоит из высокоэнергетических мюонов и вторичных фотонов.

Кроме этого, определенный вклад (существенно различный для каждой территории) в величину гамма-фона вносят излучения техногенных радионуклидов (ТРН), накопившихся (и накапливающихся) на поверхности почвенного покрова за счет глобальных и локальных выпадений из атмосферы, образовавшихся в результате испытаний ядерного оружия, многочисленных нештатных ситуаций и аварий на радиационно-опасных объектах военного и коммерческого назначения и др. К таким радионуклидам, прежде всего, относится долгоживущий радиоизотоп ^{137}Cs .

Величина гамма-фона может устанавливаться путем прямых измерений специализированной радиометрической и дозиметрической аппаратурой, а также расчетным путем, исходя из знания удельных активностей ЕРН и ТРН, содержащихся в поверхностных почво-грунтах.

На границе Емельяновского, Сухобузимского и Березовского административных районов Красноярского края расположен один из крупнейших в мире промышленный объект по производству оружейного плутония – ФГУП «Горно-химический комбинат (ГХК)», осуществляющий свою деятельность на протяжении уже нескольких десятилетий. При этом любое производство, даже в штатных условиях, неизбежно сопровождается выбросами загрязняющих веществ в атмосферу.

Цель работы - оценка степени потенциального воздействия радиационно-опасных производств ФГУП «ГХК» на территории прилегающих районов.

Материалы и методы: Для оценки гамма-фона были использованы следующие методы натурных дозиметрических измерений:

1.Метод автомобильной гамма съемки (АГС). Основной целью автомобильной гамма-съемки являлась оперативная оценка характера изменчивости гамма-фона и выявление возможных радиационных аномалий на обследуемой территории, охваченной автомобильными дорогами.

2.Площадные измерения гамма-фона на КП и ТУ дозиметрической и радиометрической аппаратурой.

Результаты: Установлено, что вклад в формирование гамма-фона на территории центральных районов Красноярского края за счет излучения ЕРН составляет порядка 58-60 %, «космический» компонент вносит около 20 %, излучения ТРН (прежде всего ^{137}Cs) глобальных и локальных выпадений обычно не превышают 20-22 %, а зачастую - гораздо меньше. При этом почвы в пределах КП и ТУ, расположенных на левобережье р. Енисей в ближней зоне от ФГУП «ГХК» (на удалении до 8...10 км, за пределами поймы Енисея), как правило, характеризуются повышенными значениями УА ^{137}Cs , достигающими значений 25-30 Бк/кг.

Таким образом, статистическая обработка полученных результатов позволила установить частотное распределение значений гамма-фона и УА основного дозообразующего техногенного радионуклида ^{137}Cs в почвенном покрове и определить средние значения этих параметров и доверительные интервалы для территории каждого из административных районов, а также количественно оценить вклад каждого из компонентов, формирующих гамма-фон. Обобщение и анализ полученных результатов с учетом географического положения, ландшафтно-геохимических и почвенных условий территории свидетельствуют о распределении вклада предприятий ФГУП «ГХК» на формирование местного гамма-фона по преобладающим ветрам.

РАДИАЦИОННО-ГИГИЕНИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ТЕРРИТОРИИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ ЗАСТРОЙКИ Г. МИНУСИНСКА

Захарова О.А.

*Сибирский федеральный университет, кафедра биофизики ИФБиБТ
А.И. Григорьев (зав. отделом радиационно-гигиенического мониторинга ФГУЗ
«Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»), В.А. Четкин
(руководитель Лаборатории радиационного контроля ООО «ГеоЛа»)
e.mail: zaolya@mail.ru*

Вопросы оценки радиационного состояния участков перспективной застройки городских территорий в последние годы приобретают все большую актуальность. При этом, помимо традиционного показателя – характеристики мощности дозы (МД) внешнего гамма-излучения (гамма-фона), особое внимание уделяется оценке радоноопасности таких участков.

Цель работы - изучение формирования МД гамма-излучения и оценка радоноопасности территории, расположенной в пределах селитебной зоны г. Минусинска. При проведении радиоэкологического обследования в 1990 г. в этой зоне было установлено наличие трех аномальных участков с МД гамма-излучением на поверхности почво-грунтов, значительно превышающим допустимые гигиенические нормативы (ГН). Все аномальные участки пространственно совпадали с выходами на дневную поверхность горных пород, характеризующихся высоким содержанием природных радионуклидов уран-радиевого семейства.

Материалы и методы: В основу настоящей работы были положены результаты натурных дозиметрических измерений МД гамма-излучения, плотности потока радона (ППР) с поверхности почвенного покрова, а также гамма-спектрометрического анализа проб почво-грунтов и кристаллических горных пород с определением удельной активности (УА) естественных (ЕРН) и техногенных (ТРН) радионуклидов.

Результаты: Статистическая обработка данных позволила установить частотные распределения значений основных нормируемых радиационных параметров (МД гамма-излучения, ППР, УА), определить их средние значения и доверительные интервалы, составить детальные карты с отображением результатов измерений, оконтурить пространственные границы аномальных участков МД гамма-излучения и ППР, и выделить зоны ограничения для строительства.

В соответствии с ГН дана комплексная оценка радиационной обстановки территории перспективной застройки, уточнены пространственные границы аномальных участков и их приуроченность к участкам повышенных концентраций ^{226}Ra , и разработаны предложения по их ликвидации и рекультивации (реабилитации), необходимые для решения вопроса о дальнейшем использовании территории по назначению.

ОСОБЕННОСТИ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ГОДИЧНЫХ КОЛЕЦ *LARIX GMELINII* (RUPR) RUPR

Почебыт Н.П.¹, Брюханова М.В.²

¹ Сибирский Федеральный Университет, Красноярск, пр. Свободный 79

² Институт леса им. В.Н.Сукачева СО РАН, 660036, Красноярск,

Академгородок 50, стр.28

e-mail: bryukhanova@ksc.krasn.ru

Известно, что различные характеристики структуры годичных колец отражают условия разных промежутков сезона роста и по-разному регистрируют изменения в окружающей среде (Ваганов, Шашкин, 2000; Vaganov et al., 2006). Сезонная и погодичная динамика числа клеток и их размеров, с одной стороны, зависит от доступности и обилия ассимилятов для построения древесины и находится под гормональным контролем, с другой – испытывает прямое и косвенное влияние внешних условий (Ваганов, 1996; Denne, Dodd, 1981 и др.). В настоящее время широко известно о водном транспорте древесных растений и его тесных связях со структурой водопроводящей системы. Строение ксилемы (т. е. расположение, длина и диаметр сосудов, толщина стенок и пор, характеризующие проводимость) регулирует эффективность водного транспорта растений (гидравлическую проводимость) (Hacke et al., 2001; Pittermann et al., 2006; Choat et al., 2008).

Цель исследования - проведение анализа анатомической структуры годичных колец лиственницы Гмелина за последние 10 лет и определение влияния климатических и эдафических факторов на механические и водопроводящие параметры древесины.

Материалы и методы: Исследования проводили в подзоне северной тайги Средней Сибири (пос. Тура Эвенкийского муниципального района Красноярского края, 64° 18' с.ш. 100° 11' в.д.). В соответствии с данными метеорологической станций, среднегодовая температура за период с 1928 по 2009 составила -9°C, общее количество осадков 370 мм / год. Исследуемый участок расположен в долине временного водотока. Тип леса кустарничково-осоково-зеленомошный с подлеском ивы. Небольшая глубина сезонного оттаивания многолетней мерзлоты обусловлена высокой льдистостью мерзлоты и наличием моховой подушки толщиной до 40 см, препятствующей прогреву минерального слоя почвы. Для исследования анатомических параметров древесины были выбраны 5 доминантных деревьев лиственницы в возрасте 50 лет. Образцы древесины были взяты из стволов деревьев возрастным буром диаметром 5 мм на высоте 1,3 м от поверхности почвы.

Измерения гистометрических параметров годичных колец лиственницы были проведены на тонких (20 мкм) поперечных срезах древесины, полученных с помощью микротомы. Ряды трахеид были измерены при помощи системы анализа изображений (Image analysis system) (Karl Zeiss, Jena) и программного пакета AxioVision. В каждом годичном кольце измерялись 5 рядов клеток от внутренней границы к внешней. Все полученные данные были обработаны с использованием статистических программ и специального программного обеспечения.

Результаты: Для периода с 2000 по 2009 г. были измерены радиальные размеры трахеид (D), толщина клеточной стенки (CWT), тангентальные размеры клеток (T), по которым затем рассчитывались такие характеристики трахеид как площадь клеточной стенки (CWA), характеризующая накопление органического

вещества клеточной стенкой, и площадь люмена (LUM), характеризующая водопроводящую способность трахеид. Также были получены данные соотношения зон ранней и поздней древесины.

Проведенные исследования подтвердили определяющее влияние температуры и влажности почвы на анатомическую структуру листовенницы в зоне распространения многолетне-мерзлотных грунтов. Выбранный район исследования и полученные для него данные существенно расширят знания о процессах транспирации и водопроведения, а также о возможных пространственных трансформациях и продуктивности листовенничных насаждений криолитозоны Средней Сибири, и позволят составить прогноз их динамики в связи с климатическими изменениями.

ГИДРОФИЗИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ВОДНОЙ ТОЛЩИ ОЗЕРА ШУНЕТ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ЭКОЛОГИЮ ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

Тарновский М.О.

Сибирский федеральный университет...Россия. г. Красноярск, пр. Свободный
3p-r-i-v-e-t8@mail.ru

Для прогноза изменений в экосистемах природных водоемов, вызванных различными внешними воздействиями, такими как изменения климата, антропогенные загрязнения и пр., требуются знания о закономерностях динамики доминирующих в них видов. Пурпурные серные бактерии (ПСБ) живут в экстремальных условиях и, с одной стороны, им нужен сероводород (который выступает донором водорода), а с другой стороны им необходим свет как источник энергии для фотосинтеза, таким образом, наиболее благоприятные условия для их жизнедеятельности формируются в зоне хемоклина (между аэробным и анаэробными слоями водной толщи) меромиктических озер, так как в нем присутствует максимум света при сохранении анаэробных условий и наличии сероводорода.

Целью данной работы является определение периодов минимальной стабильности водного столба озера, следовательно, максимальной вероятности апвеллинга (поднятия) биомассы ПСБ. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

Определить уравнение состояния воды и расчет сезонной динамики по данным натурных измерений температуры и кондуктивности.

Были измерены плотность воды разной солёности и проанализированы данные температуры и кондуктивности на разных глубинах за последние 10 лет. В результате было получено уравнение плотности для всего озера (1).

$$\rho(T, C) = 1,0034 + 1,335 \cdot 10^{-3} \cdot T - 6,2 \cdot 10^{-6} \cdot T^2 + 4,897 \cdot 10^{-4} \cdot C + 4,23 \cdot 10^{-6} \cdot C^2 - 1,35 \cdot 10^{-6} \cdot T \cdot C \quad (1)$$

Где Т – температура, С – кондуктивность.

Зная плотность, глубину и площадь озера на разных глубинах, можно найти стабильность озера по формуле

$$S = 1/A_0 \cdot \int_0^z [(z - z_{0,z}) \cdot (p_z - p) \cdot A \quad (2)$$

На основе данных о вертикальных профилях температуры и кондуктивности, полученных в ходе многолетнего ежесезонного мониторинга оз.

Шунет, была рассчитана потенциальная энергия стратификации, определяемая как минимальное количество энергии ветра, требуемое для перемешивания слоя воды до равномерных распределений без внешнего нагревания или охлаждения. Данная величина, рассчитанная нами для всей глубины озера, была максимальной в периоды летней стратификации, и минимальной – в зимний подледный период.

ТРОФОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЗООПЛАНКТОНА И ФИТОПЛАНКТОНА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО – МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бородина И.М.

Сибирский федеральный университет. Россия. г. Красноярск, пр. Свободный

Состояние водных экосистем отражает общее состояние биосферы. Качество воды природных водоемов тесно связано со структурой и плотностью биомассы микроводорослей, важнейшим фактором регуляции которых является зоопланктон. Оценка изменения количества фитопланктона в результате их взаимодействия с хищником необходима для построения эколого - математических моделей, направленных на составление прогноза и управления качеством воды.

Цель работы - исследование прямого (хищничество) и метаболитного влияния рачков *A.salinus* на численность и размерный состав микроводорослей.

Материалы и методы: Эксперименты проводили в системе проточных камер по методике (1).

Концентрации клеток *Chl.vulgaris* в собирающих емкостях определяли прямым счетом в камере Горяева под световым микроскопом. Количество пеллет определяли методом прямого счета на фильтрах. Концентрацию, размерный спектр и др. характеристики клеток естественного фитопланктона озера Шира регистрировали в автоматическом режиме с помощью системы FlowCam (FluidImaging Inc., USA).

Результаты: В ходе экспериментальных исследований с *Chl.vulgaris* зарегистрировано достоверное потребление клеток микроводорослей зоопланктоном. Повышение температуры и концентрации корма приводили к увеличению удельного суточного рациона рачков (Рис.1).

В эксперименте с естественным фитопланктоном озера Шира метаболитное влияние *Arctodiaptomus salinus* увеличивает скорость роста водорослей (Рис.2), что приводит к большему восполнению популяции и превышает потери связанные с выеданием. Стимуляция роста водорослей зоопланктоном (за счет выделения метаболитов, либо физическое разрушение колоний) на наш взгляд может иметь сигнальный характер. Активный рост микроводорослей в присутствии хищника является одним из механизмов. В присутствии зоопланктона водоросли всегда будут обеспечены биогенными элементами, поэтому они могут уйти от необходимости накопления, экономии биогенов и могут использовать их для роста.

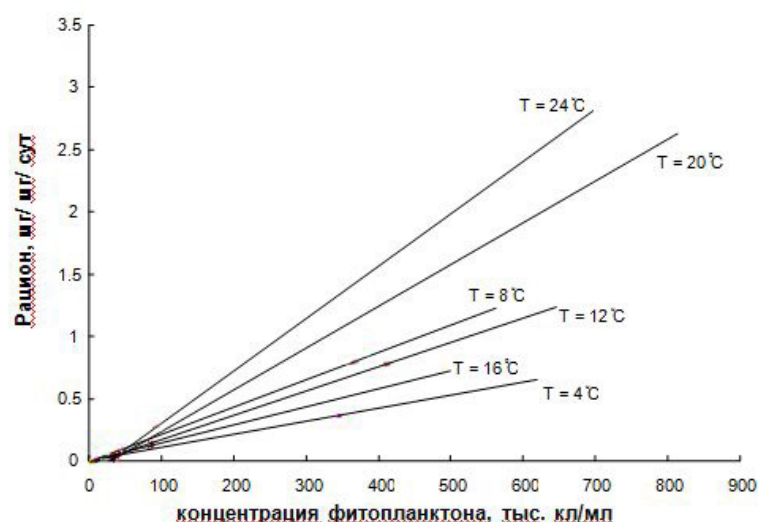


Рисунок 1. График зависимости рациона рачков от концентрации фитопланктона

Показано, что скорость образования пеллет рачками зависит от температуры и наиболее точно эта связь описывается экспоненциальной зависимостью $y=3.2e^{0.1x}$.

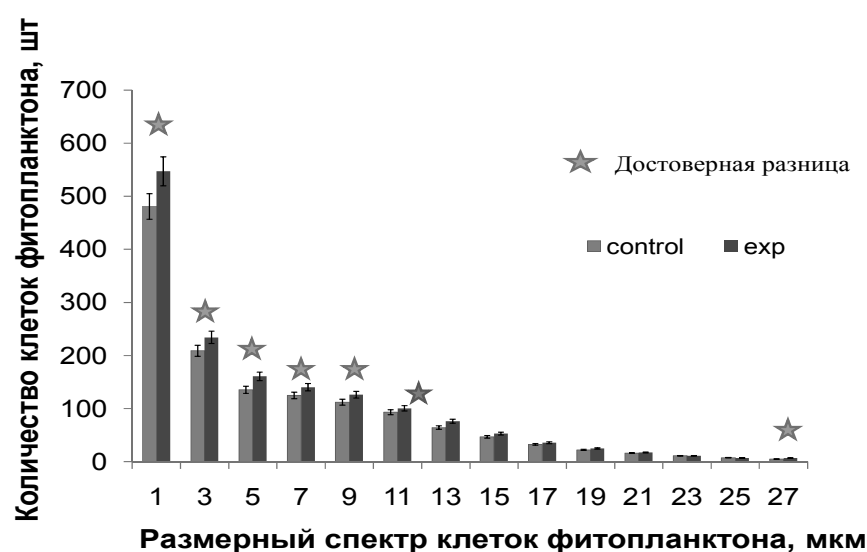


Рисунок 2. Диаграмма питания зоопланктона микроводорослями

Для подтверждения одной из гипотез стимуляции роста микроводорослей зоопланктоном была написана математическая модель на языке VBA. Результаты сценарных расчетов модели демонстрируют, что наблюдаемый в эксперименте эффект стимуляции роста микроводорослей зоопланктоном не может быть объяснен простой рециркуляцией биогенов и требует включения сигнального механизма. Максимальная разница в концентрации фитопланктона между контролем и опытом при расчетах с простой рециркуляцией биогенов составила лишь 2 %, а сигнальной до 13 %, при наблюдаемой в эксперименте разнице в 12 %.

1. М. I. Gladyshev, T. A. Temerova, O. P. Dubovskaya, Aquat. Eco. 33, p.347-353 (1999)

ЗООБЕНТОС СРЕДНЕГО ТЕЧЕНИЯ РЕКИ ЕНИСЕЙ, КАК ОБЪЕКТ КОРМОВОЙ БАЗЫ ХАРИУСА СИБИРСКОГО (*THYMALLUS ARCTICUS*, PALLAS)

Семёнова Е.М., Шулепина С.П.

Сибирский Федеральный Университет, г.Красноярск, Россия
e.mail: semenova@mail.ru

Енисей – одна из крупнейших рек России. Образована слиянием двух рек – Бий-Хем и Каа-Хем. Длина реки составляет 4102 км. Площадь водозбора Енисея 2580 тыс.км². Енисей по праву считают наиболее глубокой рекой в стране, глубина колеблется от 9 м до 70 м. Ширина Енисея достигает от 500 м до 40 км. Енисей – быстрая, прожиллистая река. Скорость течения от 2 до 5-7 м/с.

В водоемах бассейна Енисея в настоящее время обитают представители 14 семейств, включающих 46 видов и подвидов рыб. Объектом нашего изучения послужили лососеобразные, т.к. они преобладают в енисейской ихтиофауне, для исследования был выбран хариус сибирский, поскольку он является одним из наиболее фоновых видов рыб. Немаловажно также, что этот вид является уникальным объектом спортивного любительского рыболовства, так же является источником значительных доходов.

Проблема использования кормовой базы и обеспеченности рыб пищей приобретает первостепенное значение при разработке мероприятий по увеличению рыбопродуктивности водоемов, и прежде всего там, где ведется направленное изменение ихтиофауны, которое в той или иной степени меняет трофические связи в сообществе рыб. Для определения степени использования кормовой базы необходимо иметь данные о численности и биомассе кормовых организмов и состав пищевого комка рыб в водоеме.

Цель данной работы - изучение структуры зообентоса среднего течения реки Енисей и определение обилия кормовой базы хариуса сибирского (*Thymallus arcticus*, Pallas).

Материалы и методы: Отбор проб бентоса для количественного анализа производился скребком Г.Д. Дулькейта (площадь захвата 0,1 м²) в июле 2010 года на пяти участках: ст. 1, ст. 2, ст. 3 - в районе населенного пункта д. Кононово, ст. 4–в районе д. Хлопуново, ст. 5–в районе д. Атаманово. Протяженность района исследования 13-15 км. Грунт на станциях представлен илом, галькой и песком, глубина отбора проб 0,3-0,5 м. Всего собрано и обработано 30 проб бентоса. Параллельно с отбором проб бентоса, велся отлов хариуса сибирского для изъятия желудочно-кишечного тракта с целью определения состава пищевого комка, было изъято и проанализировано 86 желудочно-кишечных трактов хариуса.

Результаты и обсуждение: В составе зообентоса исследованного района р. Енисей зарегистрировано 12 видов и форм донных беспозвоночных, из них личинок двукрылых (отр. Diptera) – 4, амфипод (отр. Amphipoda) – 3, малощетинковых червей (кл. Oligochaeta) – 2. Остальные группы бентофауны: моллюски (тип Mollusca), личинки ручейников (отр. Trichoptera) и стрекоз (отр. Odonata) представлены единично.

Минимальное видовое разнообразие (2 вида) зообентоса отмечено в районе д.Кононово (ст.1). Максимальное видовое разнообразие (9 видов) зообентоса зарегистрировано в районе населенного пункта д.Кононово (ст. 2). В

донном сообществе на всех станциях чаще других встречались личинки хирономид *Pseudodiamesa gr. nivos*a, ручейников *Anabolia servata* и гаммарусы *Eulimnogammarus viridis*.

Зарегистрирован сходный видовой состав зообентоса между всеми станциями, кроме ст.1, что подтверждает коэффициент Серенсена – Чикановского ($K_{sc} = 0,5 - 0,9$).

В ходе исследования динамики плотности бентофауны зарегистрировано увеличение численности и биомассы некоторых групп донных беспозвоночных практически на всех станциях исследования от начала месяца к концу месяца.

За весь исследованный период средняя численность донных беспозвоночных составила 6130 ± 1195 экз/м², средняя биомасса - 45586 ± 9620 мг/м². Максимальная численность зообентоса (3600 ± 1444 экз/м²) зарегистрирована в районе д.Кононово (ст.3), за счет развития ручейников и гаммарусов. Максимальная биомасса (20193 ± 7803 мг/м²) бентофауны отмечена в районе д.Хлоптуново (ст.4). Основной вклад в биомассу вносили личинки двукрылых, ручейников и гаммарусы. Минимальные величины численности (936 ± 506 экз/м²) и биомассы (6576 ± 3960 мг/м²) донного сообщества отмечены в районе д.Кононово (ст.1). Зарегистрировано увеличение численности и биомассы зообентоса на всех станциях исследования от начала месяца к концу месяца.

Таким образом, зарегистрирована закономерность по развитию плотности зообентоса. Увеличение средней численности и биомассы зообентоса от начала месяца к концу месяца на всех станциях.

По численности в пробах преобладали личинки хирономид и типулид, относящиеся к группе Diptera (до 70% от общей численности), основной вклад в биомассу вносили личинки двукрылых (до 35% от общей биомассы) и амфиподы (до 53% от общей биомассы).

По данным Ежегодника (2008) средняя численность донных беспозвоночных реки Енисей (от г.Дивногорска до г.Сосновоборска) варьировала от 1040-2458 экз/м², биомасса – 6,33-15,71 г/м² и была меньше в 2 раза, чем в районе р. Енисей (д. Кононово – д. Атаманово). Доминантами по численности в р-не р. Енисей от г. Дивногорска до г. Сосновоборска были амфиподы *Eulimnogammarus viridis* и личинки двукрылых *Diamesa baicalensis*, что соответствовало доминирующему комплексу видов в р. Енисей от д. Кононово до д. Атаманово.

В составе пищевого комка хариуса в данный период основу питания составляли амфиподы. В пищевых комках отмечены представители отрядов двукрылых, ручейников, стрекоз, поденок, веснянок, класса брюхоногих моллюсков. По частоте встречаемости доминировали амфиподы (до 100% встречаемости во всех кишечных трактах), при этом их доля варьировала в пределах 50-70% от массы пищевых комков, субдоминировали личинки двукрылых – до 40% от массы пищевого комка. Это связано с тем, что хариус, полагается на зрительную рецепцию и избирательно потребляет более заметных на поверхности грунта донных беспозвоночных.

Основу численности (до 93%) и биомассы (до 85%) зообентоса составляли личинки двукрылых и амфиподы, являющиеся кормовыми объектами для хариуса сибирского. По классификации Ю.А.Шустова р.Енисей имеет средний уровень корма. Таким образом, на исследованных участках реки Енисей существуют благоприятные кормовые условия для питания хариуса.

ИНТЕНСИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ ^{32}P ГИДРОБИОНТАМИ РАЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ УРОВНЕЙ РЕКИ ЕНИСЕЙ

¹Карпов А.Д., ²Болсуновский А.Я.

¹Сибирский федеральный университет, ²Институт биофизики СО
РАН, г.Красноярск, Россия

e-mail: kasta_anton@mail.ru

В городе Железногорске Красноярского края расположен Горно-химический комбинат Росатома РФ. Эксплуатация атомных реакторов и радиохимическое производство ГХК привели к загрязнению поймы реки Енисей техногенными радионуклидами [1 - 3].

Цель данной работы: оценить накопление радиоактивного изотопа фосфора ^{32}P гидробионтами разных трофических уровней реки Енисей в зоне влияния ГХК.

Материалы и методы: Объектами исследования являлись несколько видов водных растений реки Енисей: шелковник Кауффмана (*Batrachium kauffmannii*), элодея канадская (*Elodea canadensis*), водный мох (*Fontinalis antipyretica*); один из представителей класса рыб - хариус (*Thymallus arcticus*); и основной источник рациона рыб – гаммарус (*Phylolimnogammarus viridis*). Отбор проб проводили вблизи ГХК в районе сел Атаманово и Хлоптуново, в период 2009 - 2010 гг. В связи с тем, что ^{32}P является чистым β -излучателем [2, 3], определение его в пробах проводили на основе детектирования β -излучения на альфа-бета-радиометре УМФ-2000 Российского производства.

Результаты: Экспериментальное исследование суммарной β -активности в пробах гидробионтов показало ее экспоненциальное уменьшение во времени. Показатели экспонент распадов совпали с постоянной распада ^{32}P . Основываясь на полученных результатах, были рассчитаны удельные активности ^{32}P в сухой массе гидробионтов на дату отбора [2, 3]. Используя литературные данные по содержанию ^{32}P в воде того же района [1], были рассчитаны коэффициенты накопления (КН) ^{32}P для данных видов гидробионтов. Среди гидробионтов максимальный КН ^{32}P был зарегистрирован для водного мха – 60700 л/кг, для остальных растений и гаммаруса – несколько ниже (13800-17200 л/кг).

У хариуса самый высокий коэффициент накопления ^{32}P зарегистрирован в костях (4900 л/кг), и минимальный – в мышцах (1100 л/кг). Из полученных результатов накопления ^{32}P гидробионтами видно уменьшение КН ^{32}P при переходе по трофическим уровням от водных растений к рыбе. Проведенные летом 2010 исследования показали минимальное содержание ^{32}P в гидробионтах, что объясняется остановкой последнего реактора ГХК и отсутствием поступления ^{32}P в Енисей.

Литература:

1. Вакуловский С.М., Крышев С.М., Тертышник Э.Г. и др. Накопление ^{32}P в рыбе Енисея и реконструкция дозы облучения населения // Атомная энергия. 2004. Т. 97. Вып. 1. С. 61–67.
2. Паньков Е.В., Болсуновский А.Я., Пименов Е.В. Содержание радионуклидов и мощности доз облучения отдельных видов ихтиофауны реки Енисей / Доклады IV международной конференции «Тяжелые металлы и радионуклиды в окружающей среде». Т.1 – Семипалатинск, 2006. – С. 357-361.

3. Суковатый А.Г., Болсуновский А.Я., Косиненко С.В. Оценка содержания ^{32}P в гидробионтах р. Енисей по результатам суммарной бета-активности / Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека. Мат. II Международной конф. - Томск, 2004. – С. 593-594.

ПОЛУЧЕНИЕ СТАНДАРТОВ-ЭТАЛОНОВ КАРОТИНОИДОВ ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ ФОТОТРОФНОГО СООБЩЕСТВА ОЗЕРА ШИРА

Гребенщикова А.С.¹, Рогозин Д.Ю.²

¹Сибирский федеральный университет,

²Институт биофизики СО РАН

Академгородок 50 стр. 50, Красноярск, Россия

[e.mail: ssouulluu@gmail.com](mailto:ssouulluu@gmail.com)

Меромиктическими называются озера, в которых водная толща не подвергается полной циркуляции в течение года из-за повышенной солёности придонных слоев. Особенностью меромиктических озёр является то, что в их донных отложениях осадочный материал сохраняется ненарушенным. Донные отложения таких озёр являются естественными «архивами» климатических изменений в прошлом. В лаборатории биофизики экосистем Института биофизики СО РАН проводятся палеоолиминологические исследования озера Шира. Были отобраны керны донных отложений и выявлено наличие в них годовых слоев. Индикатором меромиктического состояния озера являются скопления фототрофных серных бактерий, которые обитают в узком слое между аэробным и анаэробным слоями водной толщи. В осадочном материале биомаркерами этих бактерий являются их фотосинтетические пигменты (каротиноиды, бактериохлорофиллы). По концентрации каротиноидов анаэробных фототрофных бактерий (АФБ) в слоях донных отложений можно оценить, в какие периоды времени биомасса этих бактерий в озере была больше, а в какие – меньше. Периоды наибольшего развития АФБ соответствуют меромиктическому состоянию озера. По относительному содержанию каротиноидов в донных отложениях можно судить об изменениях уровня озера Шира в древности. Уровень озера меняется в зависимости от влажности климата в данной местности. Следовательно, анализ каротиноидов в донных отложениях озера можно рассматривать как один из методов реконструкции климата.

Цель работы - получение стандартов каротиноидов, доминирующих видов фототрофных серных бактерий для дальнейшего использования в хроматографических анализах донных отложений озера Шира. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Выделить и провести спектрофотометрический анализ каротиноидов из чистой культуры пурпурных серных бактерий *Thiocapsa sp. Shira_1* (AJ633676).
2. Очистить выделенные каротиноиды методом тонкослойной хроматографии для получения стандартов для ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Результаты: Получен окенон, основной каротиноид штамма пурпурных серных бактерий, доминирующего в озере Шира. Выделен чистый окенон для

использования в качестве эталона при калибровке методики ВЭЖХ, в частности для оценки его количества в донных отложениях.

Дальнейшая работа будет направлена на получение других стандартов каротиноидов, обнаруженных в донных отложениях озера Шира (лютеина, хлоробактина, лороксантина).

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

ФИО	стр.
Абдуллин Т.И.....	103
Аверьянова А.Б.....	79
Архипова В.В.....	73
Болсуновский А.Я.....	111,125
Барон А.И.....	30
Барцев С.И.....	99
Безруких А.Е.....	104
Бондарь В.С.....	30,33
Бородина И.М.....	121
Бояндин А.Н.....	114
Брюханова М.В.....	119
Бука Н.С.....	93
Буров А.Е.....	30
Василенья Е.С.....	59
Вашкевич П.В.....	97
Винник Ю.С.....	59
Волкова А.Г.....	99
Волова Т.Г.....	24
Гладышев М.И.	
Гончаров Д.Б.....	48
Горева А.В.....	52,55
Гребенщиков А.С.....	126
Григорьев А.И.....	116
Дементьев Д.В.....	111
Jendrossek D.....	22,32
Есимбекова Е.Н.....	104
Жила Н.О.....	38
Задереев Е.С.	
Зайцева Н.А.....	77
Замай Г.С.....	87
Замай Т.Н.....	87

Захарова О.А.....	118
Калачев А.А.....	85
Калачева Г.С.....	70
Карпов А.Д.....	125
Кислан С.Л.....	90
Коваль А.А.....	76
Комаров В.А.....	67
Коробихина К.И.....	113
Коростелева Н.С.....	79
Кравец А.Ю.....	88
Кратасюк В.А.....	94
Круглик О.П.....	63
Кудряшова Н.С.....	73,90
Кузьмина А.М.....	55
Ларина Т.Н.....	109
Лукьяненко К.А.....	107
Лысенко Е.В.....	61
Малышева Е.А.....	97
Маркелова Н.М.....	59
Миронов П.В.....	
Моргун В.Н.....	36
Мяснова Ж.С.....	64
Николаева Е.Д.....	44,47,48
Новикова Т.В.....	79
Осипова И.В.....	42
Пасечникова Ю.Ю.....	63
Парфенов В.А.....	64
Пашкова Д.Н.....	79
Печуркин Н.С.....	
Петунин А.И.....	30
Петухова А.В.....	96
Писарев В.С.....	116
Почебыт Н.П.....	119
Прудникова С.В.....	112,113
Пузырь А.П.....	30
Пуртов К.В.....	30
Рогозин Д.Ю.....	126

Руденко Н.В.....	96
Сайфуллина Д.В.....	101,102
Садовский М.Г.....	76
Сапожников В.А.....	
Семенова Е.М.....	123
Сибгатуллина Э.Э.....	98
Sinskey A.J.....	24,26,28
Смирнова Е.Ю.....	81,83
Schwendeman A.....	33
Steinbüchel A.....	27
Сырвачева Д.А.....	40
Суковатая И.Е.....	67,93,105
Суковатый А.Г.....	67
Сумарокова М.В.....	103
Сутормин О.С.....	105
Суховальская М.А.....	96
Сущик Н.Н.....	72
Тарасова А.С.....	90
Тарновский М.О.....	120
Tsatsakis A.....	37
Умняшкина О.С.....	57
Хилажаева Е.Д.....	86
Худогогов Д.Ю.....	67
Hasirci V.....	
Черняев В.А.....	94
Чечеткин В.А.....	116
Шайхутдинова. Р.В.....	96
Шахмаева И.И.....	93
Шевцова А.О.....	83
Шендрик М.А.....	57
Шишацкая Е.И.....	28,34,59
Шишацкий О.Н.....	39
Шулепина С.П.....	123
Шумилова А.А.....	47
Штильман М.И.....	22