

ХII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток 7–14 сентября 2009 г. : сборник трудов. Владивосток : ДВО РАН, 2009. – 89с.

ISBN 978-5-7442-0724-3

В сборнике представлены тезисы устных и стендовых докладов студентов, аспирантов и молодых ученых, участников ХII Всероссийской молодежной школы-конференции. В рефератах отражены результаты научных работ по приоритетным направлениям химии, биологии, прикладной биологии и медицины.

Для студентов, аспирантов, научных сотрудников и специалистов в области химии и биологии.

Оргкомитет молодежной школы-конференции

Председатель: советник РАН, член-корр. РАН В.Е. Васьковский

Члены оргкомитета: к.б.н. М.И. Кусайкин, к.б.н. Ю.В. Бурцева, к.х.н. Гладких И.Н.,
Н.Е. Спиченкова, к.х.н. Н.В. Агеенко, А.М. Захаренко.

Редакционная коллегия: В.Е. Васьковский, М.И. Кусайкин,
Ю.В. Бурцева, А.М. Захаренко

Утверждено к печати Ученым советом
Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН

ISBN 978-5-7442-0724-3

© ТИБОХ ДВО РАН, 2009

Синтез и оценка антимикробных свойств хиноидных соединений ряда бензимидазо[2,1-j]хинолина

Н.В. Агеенко^{1,2}, К.Л. Борисова¹, В.В. Куриленко³

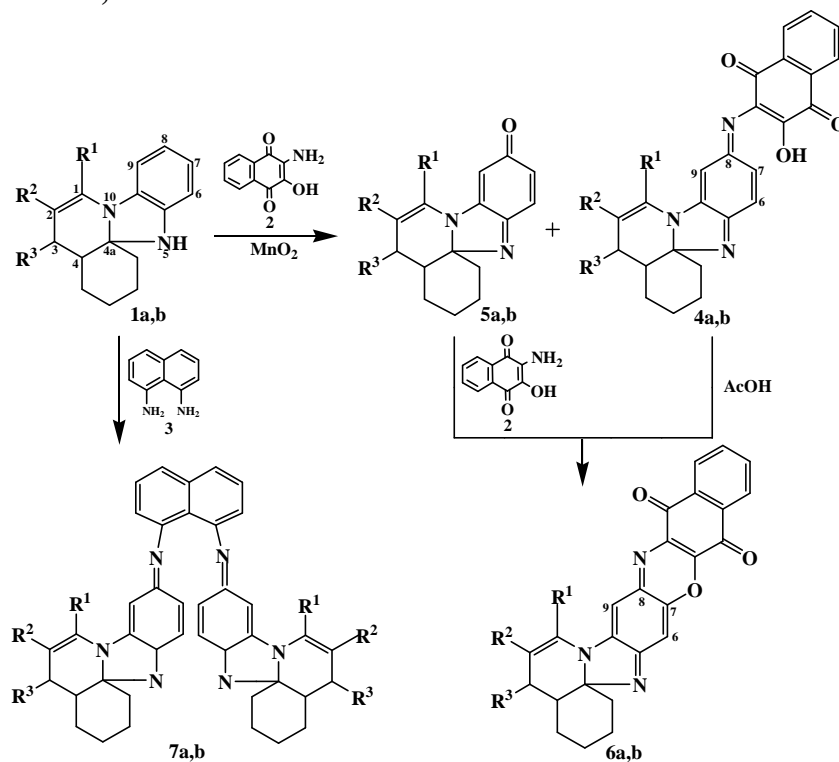
¹Дальневосточный государственный университет

²Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН

³Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: natkuprina@mail.ru

Изучены реакции окислительного сочетания в ряду гетероциклических производных бензимидазо[2,1-j]хинолина **1a,b** с 2-амино-3-гидрокси-1,4-нафтохиноном и 1,8-диаминонафталином. Окислительное сочетание протекает при комнатной температуре под действием диоксида марганца. При минимальном избытке аминокомпоненты **2,3** образуются N-замещенные хинондиимины ряда 1,2,3,4,4a,5-гексагидро-8H-бензимидазо[2,1-j]хинолина **4a,b** и **7a,b**, при этом также образуются продукты конкурирующей реакции окисления субстратов **1a,b** – хинонмоноимины **5a,b**



Сочетание соединений **1a,b** с 1,8-диаминонафталином приводит к образованию бис-продуктов **7a,b**.

При обработке хинондииминов **4a,b** уксусной кислотой при комнатной температуре происходит внутримолекулярная циклизация с образованием производных феноксазина **6a,b**.

Состав и строение полученных соединений **4a,b**, **6a,b**, **7a,b** установлены на основании элементного анализа, а также данных ИК-, ЯМР ¹H, ¹³C – спектроскопии и масс-спектрометрии.

Изучена противомикробная активность полученных енаминохинондииминов **4a**, **6a**, **7a,b** по отношению к тест-культурам грамположительных бактерий – *Bacillus subtilis* и дрожжей *Candida albicans* стандартным методом диффузии в агар с использованием лунок.

Установлено, что только синтезированное вещество **4a** активно по отношению к грамположительным бактериям – *Bacillus subtilis*, зона ингибирования в агаре при концентрациях хинондиимины **4a** – 1мг/мл и 4мг/мл – составляет 13мм. Хиноидные производные **4a**, **6a**, **7a,b** не проявляют фунгицидную активность в отношении грибка *Candida albicans*.

Роль последовательности ДНК длиной 246 пар оснований из района 3С6/С7 D. melanogaster в формирования междиска

О.В. Андреев¹, Е.Р. Бильданова^{1,2}, Е.И. Волкова¹, С.А. Демаков¹, В.Ф. Семешин¹, И.Ф. Жимулев¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

²Новосибирский государственный университет

Электронная почта: Skoro_letto@ngs.ru

Вопрос о том, какие последовательности необходимы и достаточны для формирования декомпактной структуры междисков политенных хромосом дрозофилы до сих пор остается открытым. Изучение молекулярной организации междисков осложнено их незначительными размерами, что не позволяет использовать рутинные молекулярно-генетические методы. Ранее было показано, что встройки транспозонов в районы междисков в большинстве случаев приводят к образованию новых дисков и могут быть использованы для клонирования прилегающей междисковой ДНК. Таким образом, была изучена молекулярная организация нескольких десятков междисков. Однако с помощью этого подхода сложно определить точные границы междисков и, следовательно, выявить последовательности ДНК необходимые и достаточные для формирования декомпактной структуры междисков.

В настоящей работе на примере междисковой ДНК из района 3С6/С7 мы использовали новый подход для изучения способности различных последовательностей ДНК автономно формировать междиск в заданном генетическом окружении. Тестируемые последовательности ДНК из этого района, фланкированные FRT сайтами, в составе донорного транспозона pFRTV встраивали в геном дрозофилы. После сведения таких конструкций с акцепторным транспозоном pIcon(dV) и источником FLP рекомбиназы в едином геноме происходит вырезание тестируемой последовательности из донорного транспозона по FRT сайтам и ее последующая интеграция в акцепторный транспозон. pIcon(dV) расположен в хорошо охарактеризованном цитологически районе 84F хромосомы 3 и состоит из образующих дисковые структуры последовательностей, разделенных сайтом FRT, по которому происходит встройка. Электронно-микроскопический (ЭМ) анализ препаратов политенных хромосом слюнных желез трансформированных мух позволяет выявлять в составе транспозона новые структуры, образуемые тестируемыми последовательностями.

Ранее было показано, что последовательность длиной 1,5 т.п.н. из района 3С6/С7 автономно формирует междиск в составе транспозона pIcon. Кроме того, известно, что делеция fa^{swb} длиной около 900 п.н. из района 3С6/С7 приводит к исчезновению междиска. Данный 0,9 т.п.н фрагмент ДНК в составе транспозона pFRTV был встроен в геном дрозофилы, а затем с помощью FRT/FLP рекомбинации переведен в конструкцию pIcon(dV) в районе 84F. ЭМ анализ показал, что встройка 900 п.н. в конструкцию pIcon(dV) привела к образованию нового междиска в составе этого транспозона. Таким образом, последовательность, удаляемая делецией fa^{swb} необходима и достаточна для формирования междиска.

В составе изучаемой последовательности в районе 3С6/С7 выявлен участок около 250 п.н., проявляющий гиперчувствительность к ДНКазе I. Из исходного 1,5 т.п.н. фрагмента этот участок был удален, полученная последовательность ДНК длиной 1,25 т.п.н. в составе транспозона pFRTV встроена в геном дрозофилы, а затем переведена в конструкцию pIcon(dV) в том же районе 84F. Электронно-микроскопический анализ в данном случае не выявил нового междиска в транспозоне pIcon(dV).

Таким образом, небольшой фрагмент из района 3С6/С7, содержащий ДНКазу I - гиперчувствительный сайт, является необходимым для формирования междиска. Выявление последовательности ДНК такой малой длины, ответственной за формирование междиска, позволяет начать поиск возможных консенсусов и белковых факторов, связывающихся с данной последовательностью и ответственных за формирование декомпактного состояния.

Оптимизация метода ПЦР- ПДРФ для идентификации мутаций в гене IL – 13 при аллергических заболеваниях детей Приморского края

Д.В. Бахаев¹, А.М. Стенкова¹, Ю.В. Иванова², Е.В. Просекова¹, М.П. Исаева¹

1. Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

2. Владивостокский государственный медицинский университет

Электронная почта: bakhaev.d@gmail.com

Центральную роль в аллергическом воспалении играет цитокин интерлейкина 13 (IL - 13) [1]. При изучении этого гена была установлена взаимосвязь между уровнем иммуноглобулина E (IgE) и мутациями, происходящими в IL – 13. Мутация в локусе +2044GA приводит к неконсервативной замене Arg130 на Gln и ассоциируется с увеличением сывороточного IgE, развитием аллергии [2, 3]. Кроме того, генетический полиморфизм обусловлен мутациями, которые локализуются в промоторной части гена IL-13. Показано, что замена -1112C/T приводит к увеличенной транскрипции IL–13 в некоторых иммунных клетках (Th2 и моноциты). Роль другой нуклеотидной замены в локусе -1512A/C неизвестна. Обнаружено, что у людей с мутациями по обоим аллелям в положениях IL13+2044G/A и IL13-1112C/T чаще отмечается и гиперэкспрессия и высокая активность IL-13 вариантов [4].

Для определения известных мутаций в клинической практике широко используется метод ПЦР-ПДРФ, основанный на создании или удалении сайтов рестрикции [5]. Оптимизация метода проводилась по следующим условиям: температура отжига праймеров, параметры цикла, полимеразы, подготовка ПЦР-образца для рестрикции, условия рестрикции. Условия для трёх эндонуклеаз рестрикции оптимизировали по времени инкубации и по количеству вносимой матрицы. Результаты рестрикции анализировали при помощи электрофореза в 8% ПААГ. В результате были подобраны оптимальные условия амплификации для каждой пары праймеров и условия для наилучшего проведения рестрикции.

Апробацию метода проводили на образцах ДНК, выделенной из эпителиальных клеток больных бронхиальной астмой, аллергическим ринитом, атипическим дерматитом и здоровых сверстников (было обследовано 60 детей (3-15 лет) из них 32 больных и 28 здоровых). В результате проведенного анализа были определены частоты встречаемости аллельных вариантов гена IL – 13. Выявлено, что для +2044G/A локуса частота встречаемости мутантного аллеля у больных детей составила 28%, у здоровых – 14,3%; для локуса -1512A/C частота встречаемости мутантного аллеля у больных детей 15,4%, у здоровых – 7,2%; для локуса -1112C/T частота встречаемости мутантного аллеля у больных детей 13,2%, у здоровых – 6,3%.

В результате были оптимизированы условия ПЦР-ПДРФ для идентификации мутаций в гене IL – 13 и определены частоты встречаемости аллельных вариантов гена IL – 13.

1. Heinzmann A., Mao X.-Q., Akaiwa M., Kreomer R.T., Gao P.-S., Ohshima K., et al. // Hum. Mol. Genet. 2000. V. 9, P. 549 – 559.
2. Vladich F.D., Brazille S.M., et al. // J. Clin. Invest. 2005. V. 115, P. 747 – 754.
3. Graves P.E., Kabesch M., Halonen M. // J. Allergy Clin. Immunol. 2000. V. 105, P. 506–513.
4. Hiromatsu Y., Fukutani T., et al. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2005. V.90, P. 296 – 301.
5. Nakashima H., Akahoshi M., Tanaka Y. // Methods in Molecular Biology. 2003. V.226, P. 319-322.

Влияние холестерина на подвижность спин-меченых липидов в модельных биологических мембранах

В.Н. Белослюдцева¹, Н.П. Исаев², С.А. Дзюба²
¹Новосибирский Государственный Университет
²Институт Химической Кинетики и Горения СО РАН
Электронная почта: dahaka@ngs.ru

Холестерин и его производные являются важными составляющими клеточных мембран. Известно, что стеринны меняют их свойства, но, несмотря на многочисленные работы, до сих пор точно не известны функциональные и структурные изменения мембран, вызванные холестерином.

Информация о типах движения внутри модельной биологической мембраны напрямую связана с ее функциональностью, а исследования при низких температурах важны для нахождения движений с низкими энергетическими барьерами и определения оптимальных условий для замораживания живых тканей. Целью настоящей работы является изучение влияния холестерина на подвижность спин-меченых липидов в модельных биологических мембранах при криогенных температурах.

Для изучения динамики был использован метод стимулированного электронного спинового эхо (СЭСЭ), который позволяет фиксировать сверхмалоамплитудные движения порядка 0.1° - 1° и разделять вклады от быстрых ограниченных движений с временами корреляции $\tau_c < 10^{-6}$ с и медленных движений $\tau_c \sim 10^{-6} \div 10^{-5}$ с.

В данной работе использовался метод получения многослойных везикул в водном растворе. Были приготовлены 2 вида образцов: раствор чистого липида ПОФХ (1-пальмитоил-2-олеоил-фосфотидилхолин) и раствор липида ПОФХ с холестерином в молярном отношении 1:1. В качестве спиновых зондов использовались фосфолипиды, меченые в 5 и 16 положении алкильной цепи (1- пальмитоил-2-стеароил-5-Доксил-глицеро-фосфохолин, 1- пальмитоил-2-стеароил-16-Доксил-глицеро-фосфохолин), молярное отношение спиновых зондов к молекулам матрицы составляло 1:100.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в модельной мембране холестерин увеличивает амплитуды быстрых ограниченных движений, этот эффект может быть связан с упорядочивающим действием холестерина. Присутствие холестерина в мембране подавляет медленные вращательные движения около метки в 5 положении и увеличивает амплитуды медленных движений вблизи метки в 16 положении, что может быть связано с конденсирующим эффектом холестерина. Добавление холестерина в мембрану приводит к сегрегации меченых и немеченых липидов, что может быть связано с образованием рафтов.

Дневная динамика окислительных процессов и активности антиоксидантных ферментов у морских красных водорослей Японского моря

Е.С. Белоциценко, Ю.В. Набивайло, И.М. Яковлева

Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: belotsotsenko_es@mail.ru

Морские макрофиты занимают обширные площади морского дна и на мелководных участках шельфа в умеренных широтах являются основными продуцентами первичного органического вещества. Известно, что на мелководье или литорали в середине солнечного дня летних месяцев макроводоросли часто подвергаются воздействию высоких интенсивностей солнечной радиации и резким колебаниям температуры. Исследования, проведенные ранее на микроводорослях, показывают, что реакция растений на эти стрессовые факторы обусловлена повышенной продукцией активных кислородных радикалов (АКР) в их тканях, и что окислительный стресс является одним из основных факторов, повреждающих водоросли на клеточном уровне. Для нейтрализации АКР морские макрофиты выработали систему антиоксидантных механизмов защиты, одним из универсальных компонентов которой являются защитные ферменты супероксид дисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) и аскорбат пероксидаза (АП). Однако, до сих пор остается не ясным характер изменения активности этих ферментов и уровень фотоокислительного повреждения в тканях морских макрофитов в течение дня.

В представленной работе нами была исследована дневная динамика изменений в уровне окислительного стресса, а также активности антиоксидантных ферментов и фотосинтетического аппарата у двух красных водорослей *Grateloupia divaricata* и *Laurencia nipponica*, обитающих в заливе Восток Японского моря.

Установлено, что изменения скорости потенциального фотосинтеза у *L. nipponica* в течение дня выражались одновершинной кривой с максимумом в полуденное время. Отмечена способность этой водоросли удерживать стабильный уровень фотосинтетической продукции в период наивысшей солнечной инсоляции. У *G. divaricata* наблюдалась полуденная депрессия потенциального фотосинтеза, что, по-видимому, было обусловлено сочетанием высоких интенсивностей падающей радиации (около 2000 мк Э / (м² сек)) и повышенной температурой воды (до 24 – 25 °С). Оценка уровня окислительного стресса в тканях водорослей в течение дня показала, что содержание малонового диальдегида (МДА, индикатора уровня перекисного окисления липидов) увеличилось к полудню у обеих водорослей. Однако, у *G. divaricata* уровень МДА оставался стабильным (в пределах 4,8-5,2 μmol/gFW) до вечера, в то время как у *L. nipponica* происходило постепенное снижение его концентрации в течение второй половины дня, что указывает на значительно меньшее повреждение клеточных структур *L. nipponica*. Это согласуется с достоверно более высоким содержанием перекиси водорода (H₂O₂) в тканях *G. divaricata* во второй половине дня по сравнению с таковым у *L. nipponica*. Активность СОД в талломах исследованных водорослей достигала максимальных величин к полудню, оставаясь стабильно высокой до 18:00. Это подтверждает функцию СОД как первой линии защиты от АКР, образующихся в результате фотоокислительного стресса. Концентрация АП варьировала в течение дня, достигая максимума в 15:00 у *L. nipponica* (13 μmol/gFW) и в 18:00 у *G. divaricata* (19 μmol/gFW). У *G. divaricata* отмечена задержка в активации АП в первую половину дня. Активность КАТ оставалась неизменной в течение дня у обеих исследованных видов водорослей.

На основе проведенных исследований можно заключить, что уровень фотоокислительного стресса в талломах морских макрофитов в течение дня регулируется количеством падающей солнечной радиации и колебаниями температуры воды. Чувствительность красных водорослей к фотоокислительным повреждениям в середине солнечного дня летних месяцев может быть обусловлена снижением активности СОД и антиоксидантных ферментов аскорбат-глутатионового цикла, осуществляющих детоксификацию перекиси водорода в тканях растений.

Особенности тонкого строения биссуса трех видов митилид (Mollusca: Bivalvia) в связи с прикрепленным образом жизни в разных биотопах

Е.Е. Вехова

Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: evechova@mail.ru

Двустворчатые моллюски семейства Mytilidae прикрепляются к субстрату с помощью биссусного аппарата, состоящего из корня, глубоко внедренного в ткани ноги, биссусного стебля и отходящих от него биссусных нитей, выделяемых ногой. Образование новых нитей происходит на протяжении всего онтогенеза, что позволяет моллюскам поддерживать прочную связь с субстратом и сохранить стабильное положение во время шторма. Целью работы было изучить характерные черты организации биссусных нитей и борозды ноги у трех обычных представителей донных сообществ Японского моря – мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853), мидии блестящей *Mytilus coruscus* Gould, 1861 и модиолуса *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758), которые обычно пространственно разобщены и занимают разные биотопы.

Проведенный сравнительный анализ особенностей организации и функционирования биссусных нитей моллюсков позволяет отметить следующее:

1. Исследование морфологии биссусных нитей показало, что эти виды имеют сходный план строения, отражающий их функциональное значение. В составе нити различают манжету, обеспечивающую прочную связь нити с моллюском, рифленую, растяжимую проксимальную часть (1/3 длины нити), абсорбирующую механическое напряжение, относительно гладкую, жесткую дистальную (2/3 длины нити), выполняющую роль швартового каната между двумя “крепежами”, заканчивающуюся клейким диском, прикрепляющим моллюска к субстрату и переходные зоны, совмещающие черты морфологии смежных участков нити.
2. Самые короткие толстые нити с очень крупными прикрепительными дисками характерны для *M. coruscus*, а наиболее длинные и сравнительно тонкие нити с продолговатыми дисками – для *M. modiolus*. У *C. grayanus* нити имеют промежуточные характеристики. Значительная вариабельность длины нитей у каждого вида отражает последовательные этапы процесса закрепления моллюска на грунте, особенности образа жизни (полупогруженный/на поверхности грунта) и условия обитания каждой особи.
3. Анализ тонкого строения биссусных нитей показал, что виды различаются степенью развития отдельных частей нити. Так, например, у мидии блестящей ширина проксимальной части составляет 220-250 мкм, у мидии Грея – 100-135, у модиолуса – 50-110 мкм. Борозда ноги, в которой формируются нити, отражает морфологические особенности строения нитей каждого вида и различается по размеру и параметрам.
4. Прочность нитей на разрыв по мере роста моллюсков увеличивается. При равном размере тела самые прочные нити свойственны для мидии блестящей, а мидия Грея и модиолус характеризуются сходными значениями этого показателя. Прочность прикрепления моллюсков к субстрату у разных видов различна и в процессе жизни увеличивается в соответствии с межвидовыми различиями изменения в онтогенезе прочности нитей.
5. Наблюдаемые различия отражают адаптации видов к прикрепленному образу жизни в разных биотопах. Мидия блестящая успешно заселяет сравнительно прибойные скальные участки побережий на глубине 0,2-3 м, модиолус обитает преимущественно в глубоководных и защищенных от волнобоя участках дна с мягкими осадками, мидия Грея обитает на твердых скально-валунных грунтах в разных по степени прибойности биотопах на глубине 1-60 м.

Данная работа выполнена за счет гранта 09-III-B-06-254 (поддержка исследований молодых ученых ДВО РАН).

Особенности ультраструктурного строения игл морских ежей семейства *Strongylocentrotidae*

В. В. Винникова, А. Л. Дроздов
Институт биологии моря ДВО РАН
Электронная почта: sharman-ka@mail.ru

С помощью сканирующего электронного микроскопа изучена ультраструктура первичных игл семи видов морских ежей сем. *Strongylocentrotidae*: род *Strongylocentrotus*, виды *S. nudus* (A. Agassiz, 1863), *S. intermedius* (A. Agassiz, 1863), *S. droebachiensis* (Muller, 1776), *S. polyacanthus* (Agassiz & Clark, 1907), *S. pallidus* (Sars, 1871), *S. franciscanus* (Agassiz, 1863); род *Alloccentrotus* Mortensen, 1942, вид *A. fragilis* (Jackson, 1912) с целью выявления таксономически значимых признаков ультраструктурой морфологии игл и уточнения системы этого семейства.

Иглы *S. intermedius* обладают широким полиморфизмом. Различают иглы несущие многочисленные ряды отчетливых зубчиков (от 3 до 7), иглы, покрытые продольной штриховкой и бугорками дистально, проксимально и равномерно по отношению ко всей поверхности иглы, гладкие иглы. На поперечном спиле ребра иглы широкие, уплощенные, прямоугольной или слегка трапециевидной формы, как у *S. pallidus*, и *Alloccentrotus fragilis*. Однако, поверхность продольных ребер *S. pallidus* – гладкая, а у *A. fragilis* наряду с продольной штриховкой присутствуют поперечные гребни. Таким образом, по структуре игл *A. fragilis* мало отличается от других видов рода *Strongylocentrotus*, имеющих на поперечном срезе правильную концентрическую структуру, и вероятно, что выделение вида *S. fragilis* новый монотипный род оказалось нецелесообразным.

Продольные ребра *S. polyacanthus*, *S. droebachiensis*, *S. nudus* и *S. franciscanus* имеют выпуклую наружную поверхность, на поперечном срезе, которая у *S. polyacanthus* и *S. droebachiensis* имеет прямоугольную, а у *S. nudus* и *S. franciscanus* – петельковидную формы. Кроме того, сердцевина двух последних видов не образует правильных концентрических колец. Своеобразна для каждого вида микроскульптура наружной поверхности продольных ребер, которая у *S. nudus* и *S. franciscanus* представлена частыми поперечными рядами зубчиков, у *S. nudus* – 3 - 5, а у *S. franciscanus* – 10-12 зубцов в каждом.

Поверхность продольных ребер *S. droebachiensis*, покрыта частыми поперечными складками, несущими широко расставленные зубчики по 6 –9 зубцов, а у *S. polyacanthus* – гладкая.

Сравнение ультраструктуры игл *S. nudus* и *S. franciscanus* с остальными представителями рода *Strongylocentrotus* показало, что эти два вида являются наиболее близкими друг к другу, поэтому представляется необходимым выделить *S. nudus* и *S. franciscanus* в самостоятельный род – *Mesocentrotus*.

Сульфатирование бергенана, пектина бадана толстолистного *Bergenia crassifolia*

Ф.В. Витязев¹, А.С. Шашков²

¹Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, Первомайская, 50;

тел/факс: (8212)241001; Электронная почта: rodefex@mail.ru

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский пр., 47;

тел/факс: (495)135-5328; Электронная почта: shash@ioc.ac.ru

Большой класс растительных полисахаридов составляют пектины, присутствующие практически во всех высших растениях, не имеющие, как правило, в своем составе сульфатных групп и проявляющие разностороннюю физиологическую активность: иммуномодулирующую, антидотную, антиоксидантную, гастропротективную. На примере таких растительных полисахаридов как целлюлоза, хитозан, декстран показано, что введение сульфатных групп в их структуру приводит к изменению свойств, в частности, к появлению у них антикоагулянтных свойств. До настоящего времени не изучено влияние введения сульфатных групп в макромолекулу пектинов на их свойства.

В данной работе изучены условия сульфатирования бергенана, пектина бадана толстолистного, и галактуронана как главной углеводной цепи пектинов, определена зависимость степени сульфатирования от условий проведения реакции и сульфатирующего реагента.

В качестве сульфатирующих реагентов использованы пиридин монометилсульфат, пиридинсульфотриоксид, хлорсульфоновая кислота. Показано, что оптимальным реагентом для сульфатирования галактуронана и пектинов является хлорсульфоновая кислота. Получены производные галактуронана и бергенана с различной степенью сульфатирования. Методом ВЭЖХ показано, что в процессе сульфатирования происходит деструкция углеводной цепи галактуронана и бергенана, которая сопровождается образованием фрагментов с Mw 50 кДа.

Полученные сульфатированные производные исследованы методом ЯМР-спектроскопии и показано, что при сульфатировании происходит замещение гидроксильных групп остатков галактуроновой кислоты по второму и частично по третьему положению. Количественное определение сульфатных групп проводили спектрофотометрическим методом Доджсона. Установлено, что степень сульфатирования галактуронана зависит от метода сульфатирования и составляет от 9% до 39%.

Противоопухолевая активность фукоиданов Дальневосточных бурых водорослей

О.С. Вищук¹, С.П. Ермакова¹, Т.Н. Звягинцева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: vishchuk@mail.ru

Смертность от раковых заболеваний остается одной из лидирующих в современном мире. К сожалению, имеющиеся в распоряжении онкологов токсичные препараты действуют не селективно, повреждая не только раковые, но и нормальные клетки и системы. Поэтому поиск природных нетоксичных веществ обладающих противоопухолевой активностью является актуальным.

Полисахариды бурых водорослей – фукоиданы обладают широким спектром биологической активности, включая антикоагулянтную, противоопухолевую, иммуномодулирующую, антиоксидантную, противовирусную активности [1]. Однако, несмотря на интенсивность изучения этих полисахаридов, с определенной уверенностью установить структуру, и тем более, структурные элементы, отвечающие за проявление той или иной биологической активности фукоиданов, пока не удалось.

Цель данной работы – изучение противоопухолевой активности фукоиданов, выделенных из бурых водорослей Дальнего Востока и имеющих разную структуру.

Фукоиданы были выделены по модифицированному методу [2] из 3 видов бурых водорослей: *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens*, *Undaria pinatifida*, собранных на побережье Японского и Охотского морей. Структурные характеристики полисахаридов определяли с помощью аналитических и физико-химических методов анализа, в том числе ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Цитотоксичность фукоиданов устанавливали на клетках рака кишечника человека DLD-1. Противоопухолевое действие фукоиданов оценивали с использованием метода мягких агаров [3].

Установлено, что фукоиданы из *L. cichorioides*, *F. evanescens* и *U. pinatifida* отличаются друг от друга по типу связи остатков L-фукозы, моносакхаридному составу и степени сульфатирования полисахаридов. Так, фукоидан из бурой водоросли *L. cichorioides* построен преимущественно из α-1→3 связанных остатков L-фукозы; фукоидан из *F. evanescens*, содержит в цепи чередующиеся α-1→3- и α-1→4-связанные остатки L-фукозы; в свою очередь, фукоидан из *U. pinatifida* построен из остатков α-L-фукозы и β-D-галактозы, связанных 1→3-О-гликозидной связью; содержание сульфатных групп - 35, 21, 29 %, соответственно. Показано, что фукоиданы нетоксичны по отношению к DLD-1 клеткам в концентрациях до 200 мкг/мл.

Фукоиданы ингибировали рост колоний клеток рака кишечника человека при концентрации 50 мкг/мл в различной степени, что связано с особенностями их структуры. Так, фукоидан из *L. cichorioides*, ингибировал рост колоний клеток рака кишечника человека DLD-1 на 76 % по сравнению с контролем. Обработка клеток фукоиданами из *F. evanescens* и *U. pinnatifida* приводила к снижению количества колоний DLD-1 клеток на 58 % и 40 %, соответственно.

Таким образом, сравнительное изучение противоопухолевой активности фукоиданов, выделенных из разных видов бурых водорослей и имеющих разную структуру, позволило предположить, что для проявления противоопухолевой активности фукоиданов необходимо наличие 1→3-связанной α-L-фукозы с высокой степенью сульфатирования.

Полученные данные могут представлять несомненный интерес, поскольку использование ингибиторов роста колоний раковых клеток в нетоксических дозах может оказаться перспективным подходом при создании противоопухолевых препаратов.

1. Kusaykin, M., Bakunina, I., Sova and et. al. // Biotechnol. J. 2008. V. 3. P. 904-15.
2. Шевченко, Н.М., Кусайкин, М.И., Урванцева и др. // Патент RU 2240816. 2004. БИ 33. С. 444-445.
3. Colburn, N.H., Wendel, E.J. and Abruzzo, G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 6912-6.

Оценка экологического состояния почв г. Владивостока по содержанию токсических элементов

М.В. Газетдинов, А.И. Андреева
Дальневосточный государственный университет
Электронная почта: neues@bio.dvgu.ru

Одним из важных показателей экологического состояния больших городов на территории России является оценка загрязнения почв токсичными элементами. К числу наиболее опасных загрязняющих веществ, способных накапливаться в почвах и при этом не разрушаться, относятся тяжелые металлы (ТМ). В г.Владивостоке (Приморский край, РФ), как и во многих других больших городах, имеются источники загрязнения почвогрунтов тяжелыми металлами. К ним относятся: ТЭЦ-1, ТЭЦ-2, 38 крупных котельных. Большой вклад в загрязнение экосистемы города вносят транспорт и транспортные предприятия (авторазборки, автостоянки, ремонтные мастерские).

Цель работы: мониторинг почвогрунтов г. Владивостока по содержанию ТМ с использованием биологических индикаторов. В задачи исследования входило определение элементов почво-грунтах и в корнях и листьях одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.). Отбор проб производился в соответствии с ГОСТ 24.027.0-80 и ГОСТ 17.4.3.01-83 в августе 2008 года. Подготовка почв к атомно-абсорбционному определению элементов проводилась методом кислотной минерализации, согласно ИСО 11466. Анализ содержания металлов (Cu, Zn, Ni, Pb, Co, Cd, Hg) был проведен на атомно-абсорбционном спектрофотометре Shimadzu AA-6601F.

Содержание элементов в почвогрунтах отдельных районов города превышало ПДК для цинка, свинца и меди в 10-30 раз, на станциях, расположенных в Первомайском (цинк 108-1519 мг/кг, свинец 57,4-117,7 мг/кг, медь 248-276 мг/кг) и Советском районах города (цинк 203-551 мг/кг, свинец 150-199 мг/кг, медь 76,7-108 мг/кг). Отмечено превышение ПДК металлов в 2-4 раза на станциях в Ленинском и Первореченском районах. Превышение ПДК для кобальта и цинка в 1.2-2.2 раза было обнаружено в пробах почвогрунтов рядом с транспортной развязкой, расположенной в Первомайском районе (кобальт 8,5 мг/кг, цинк 108,3 мг/кг). Анализ органов одуванчика лекарственного, произраставшего на обследованных территориях, показал наличие различного содержания токсикантов, как в самих органах так и в почво-грунтах, на котором произрастали растения. Концентрация в листьях отобранных растений превышала фоновую в 2-20000 раз (свинца 32,4-176 мг/кг сухой массы, цинка 85,7-225 мг/кг, кадмия 0,7-15707 мг/кг, меди 28,3-63,9 мг/кг, никеля 0,01-9,3 мг/кг). При этом накопление токсикантов в корнях было меньшим по сравнению с листьями (цинка 34,5-74 мг/кг сухой массы, кадмия 0,54-0,69 мг/кг, меди 14,6-54,4 мг/кг, никеля <0,01 мг/кг), что связано с онтогенетическим состоянием растений и накоплением большего количества металлов генеративными частями растения. Использование коэффициента поглощения выявило наличие большого количества подвижных форм ТМ. Высокие значения коэффициента характерны для свинца от 40 до 1710, кадмия от 4 до 24542, никеля от 2 до 930.

Таким образом, мониторинг почвогрунтов г. Владивостока по содержанию тяжелых металлов выявил концентрации токсиканта выше предельных значений. Также было установлено высокое содержание ТМ в корнях и листьях одуванчика лекарственного, которое показало накопление растениями токсиканта, а также указало на наличие подвижных форм элементов в почвогрунтах. Проведенные исследования подтверждают опасность имеющихся источников загрязнения в черте города.

Современные методы теоретического конформационного исследования олиго- и полисахаридов

А.Г. Гербст, А.А. Грачев, А.С. Шашков, Н.Э. Нифантьев
Институт Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Ленинский проспект 47, 119991, Москва.
Электронная почта: *alger@ioc.ac.ru*

Значительное число работ в современной химии углеводов посвящено изучению их биологической активности. Это относится как к олиго-, так и к полисахаридам. В последнее время все больше внимания уделяется изучению пространственных механизмов биологического взаимодействия углеводов с природными рецепторами и направленному дизайну структур с заданной активностью. Развитие этого направления невозможно без совершенствования методов теоретического конформационного анализа углеводов. В данном докладе проводится обзор как собственных работ, так и работ других авторов, использующих различные методы молекулярного моделирования углеводов.

Рассматриваются случаи применения различных молекулярно-механических силовых полей и методов квантовой механики, их преимущества и недостатки при конформационном анализе сахаров. Так же обсуждается применение молекулярной динамики для изучения конформаций гликозидной связи. Уделено внимание методам моделирования углеводов-белковых взаимодействий: молекулярная динамика, метод Монте-Карло, генетический алгоритм.

Кроме теоретических аспектов изучения конформаций углеводов, кратко рассмотрены некоторые основные методы спектроскопии ЯМР, используемые в данной области. В частности, проводится анализ методов установления структуры полисахаридов по спектрам ЯМР с привлечением различных методик: инкрементный подход, а так же применение искусственных нейронных сетей.

Работа проведена при финансовой поддержке грантов Президента Российской Федерации для молодых ученых МК-5879.2008.3 и Российского фонда фундаментальных исследований (№08-03-00884-а).

Конформационная стабильность и взаимодействие с протеиназами ингибитора сериновых протеиназ InhVJ из актинии *Heteractis crispa*

Т.И. Вакорина, И.Н. Гладких, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская
 Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
 Электронная почта: irinagladkikh@gmail.com

Актинии наряду с нейротоксинами, пороформирующими токсинами (актинопоринами) и фосфолипазами A₂ продуцируют огромное количество ингибиторов протеиназ пептидной природы. Ингибиторы протеиназ из актиний представляют интерес, главным образом, вследствие своей способности ингибировать целый ряд протеиназ различной специфичности [1]. Все ингибиторы протеиназ актиний, подавляющие активность сериновых протеиназ (трипсина, химотрипсина, тромбина, калликреина), относят к семейству ингибиторов Кунитца. Хорошо изученным представителем этого семейства является бычий панкреатический ингибитор трипсина (БПТИ) [2]. Интересно, что кроме трипсинингибирующей активности представители данного класса соединений проявляют и другие биологические функции. Так установлено, что AsKC1-3 или каликлидины 1-3 из *Anemonia sulcata* [3] и SHTX III из *Stihodactyla haddoni* [4] блокируют потенциал-зависимые калиевые каналы. Два ингибитора RmIn I и RmIn II из актинии *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) обладают антигистаминной активностью [5]. Более того, из актинии *H. crispa* недавно выделен первый анальгетический полипептид (APHC1), ингибирующий TRPV1 каналы [6].

Ингибитор сериновых протеиназ InhVJ (6106 Да) семейства Кунитца был ранее выделен из тропической актинии *H. crispa* комбинацией методов гидрофобной, гель-фильтрационной, ионообменной хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ [7]. Методом спектроскопии КД изучено влияние температуры и величины pH среды на пространственную организацию молекулы InhVJ на уровне третичной и вторичной структуры. Показано, что молекула InhVJ обладает высокой конформационной термо- и pH-стабильностью. Определена точка конформационного термо-перехода полипептида (70 °C), после которой молекула переходит в денатурированное устойчивое состояние с сохранением 80% ингибирующей активности. Установлено, что значительные частично обратимые изменения в пространственной организации молекулы происходят на уровне третичной структуры в диапазоне значений pH 11,0–13,0, что можно объяснить разрывом дисульфидных связей и ионизацией остатков тирозина. При низком значении pH (2,0) раствора молекула InhVJ конформационно стабильна. Тушение остатков тирозина акриламидом показало, что два остатка доступны для тушения полностью, в то время как третий доступен частично. Методом собственной белковой флуоресценции трипсина и α-химотрипсина установлен различный характер связывания ингибитора InhVJ с протеиназами. Показано, что константы ассоциации (K_A) для пар трипсин/InhVJ и α-химотрипсин/InhVJ составляют 2,5×10⁷ М⁻¹ и 7,0×10⁶ М⁻¹ соответственно, что хорошо согласуется со значениями, определенными методом биосенсорного анализа [8].

1. Delfin J., Martinez I., Antuch W., Morera V., Gonzalez Y., Rodriguez R., Marquez M., Saroyan A., Larionova N., Diaz J., Padron G., Chavez M. // *Toxicon*. 1996. V. 34. P. 1367-1376.
2. Kunitz M., Northrop J. // *J. Gen. Physiol.* 1936. V. 19. P. 991-1007.
3. Schweitz H., Bruhn T., Guillemar E., Moinier D., Lancelin J.M., Béress L., Lazdunski M.J. // *Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25121-25126.
4. Honma T., Kawahata S., Ishida M., Nagai H., Nagashima Y., Shiomi K. // *Peptides*. 2008. V. 29. P. 536-544.
5. Сокотун И.Н., Ильина А.П., Монастырская М.М., Лейченко Е.В., Еськов А.А., Анастюк С.Д., Козловская Э.П. // *Биохимия*. 2007. Т. 72, С. 368-374.
6. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 23914-23921.
7. Сокотун И.Н., Лейченко Е.В., Вакорина Т.И., Еськов А.А., Ильина А.П., Монастырская М.М., Козловская Э.П. // *Биоорганическая химия*. 2007. Т. 33. С. 448-455.
8. Сокотун И.Н., Гнеденко О.В., Лейченко Е.В., Монастырская М.М., Козловская Э.П., Мольнар А.А., Иванов А.С. // *Биомедицинская химия*. 2006. V. 52. P. 595-600.

**Изучение механизма образования междисков политенных хромосом слюнных желез
*Drosophila melanogaster***

А.А. Гончарова¹, М.Б. Беркаева¹, С.А. Демаков¹
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
Электронная почта: jester_elan@mail.ru

Политенные хромосомы слюнных желез личинок дрозофилы представляют собой пучки из нескольких тысяч параллельно расположенных хроматид, каждая из которых соответствует интерфазной хромосоме с характерным рисунком чередования хромомеров и межхромомеров. Эти рисунки совпадают при политении, что приводит к образованию компактных дисков и декомпактных междисков, соответственно. В отличие от достаточно хорошо изученных дисков, функции междисков и механизм их формирования остаются невыясненными.

В данный момент изучено 13 междисков, которые были клонированы с помощью встройки Р-транспозонов в эти районы. В результате анализа последовательности ДНК этих районов было показано, что значительная часть междисков образована регуляторными участками генов, неактивных в слюнных железах на поздних личиночных стадиях. В связи с этим было выдвинуто предположение, что междиски могут быть промоторами генов, которые ранее транскрибировались в слюнных железах на эмбриональных стадиях.

Для подтверждения этой гипотезы было решено проверить, будет ли декомпактным участок диска политенной хромосомы личинки, если в нем направленно активировать транскрипцию на эмбриональной стадии.

Суть подхода заключается в использовании дрожжевой системы генетической активации GAL4/UAS, которая активна во многих организмах, в том числе и в дрозофиле. В драйверной линии мух белок GAL4 экспрессируется под контролем какого-либо тканеспецифичного промотора, а акцепторная линия несет последовательность UAS. При скрещивании этих линий GAL4 связывается с UAS и в определенное время в определенной ткани активируется транскрипция последовательности, следующей после UAS.

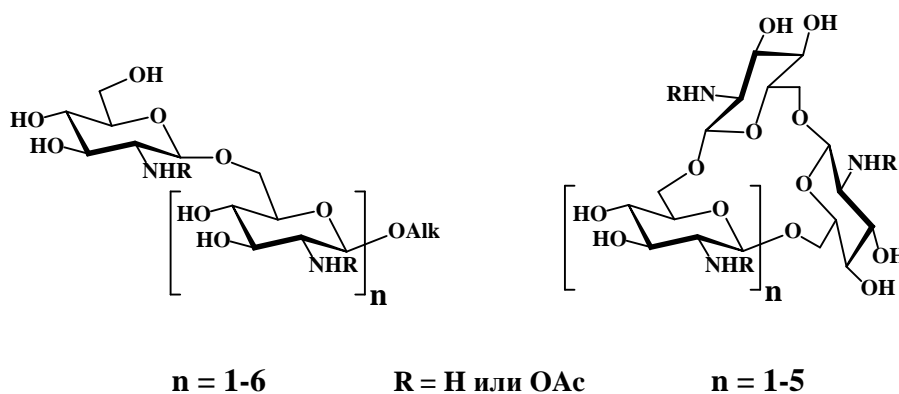
В этой работе была использована акцепторная линия EP, содержащая встройку Р-транспозона с UAS последовательностью в хорошо изученном на цитологическом и молекулярном уровнях диске 10A1-2 X-хромосомы. Встройка находится далеко от ближайших сайтов инициации транскрипции известных генов, так что активация транскрипции геномной ДНК, прилежащей к транспозону EP, с помощью UAS не вызывает экспрессии этих генов. В качестве драйверной линии была использована линия (P(GawB)34B), содержащая ген Gal4 под контролем промотора, который работает в слюнных железах на эмбриональной стадии, что было успешно подтверждено в контрольном эксперименте. В результате скрещивания выбранных линий была активирована транскрипция последовательности из диска 10A в слюнной железе на эмбриональной стадии. Из этих слюнных желез на личиночной стадии были приготовлены препараты политенных хромосом, которые демонстрировали заметную деконденсацию части диска 10A в районе встройки EP. В качестве контроля были использованы препараты с линией со встройкой без драйвера. Расщепление диска подтверждает выдвинутую гипотезу, а изучение конкретного механизма этого процесса является предметом наших дальнейших исследований.

**Конформационное исследование линейных и циклических β -(1 \rightarrow 6)-
олигоглюкозаминов, структурно родственных внеклеточному полисахариду бактерии
*Staphylococcus aureus***

А.А. Грачев, А.Г. Гербст, М.Л. Генинг, Д.В. Титов, Ю.Е. Цветков, А.С. Шашков,
Н.Э. Нифантьев
Институт Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Ленинский проспект 47, 119991,
Москва.
Электронная почта: grachevaa@mail.ru

Линейный поли- β -(1 \rightarrow 6)-N-ацетилглюкозамин (PNAG) является фрагментом внеклеточного полисахарида, продуцируемого стафилококками и другими бактериями. Иммунизация экспериментальных животных данным полисахаридом способствует возникновению иммунной реакции на стафилококковую инфекцию. Для определения эпитопов в цепи PNAG, ответственных за его иммунологическую активность, нами проводится систематический конформационный анализ синтетических олигосахаридов родственных фрагментам PNAG-а.

В данной работе проведено изучение уникальной серии линейных и циклических олиго- β -(1 \rightarrow 6)-глюкозаминов с числом моносахаридных остатков от двух до семи. При этом были рассмотрены как свободные глюкозамины, так и их N-ацетильные производные. Конформационный анализ проводился на основании экспериментальных величин констант спин-спинового взаимодействия ($J_{C,H}$ и $J_{H,H}$) и молекулярно-динамических (МД) симуляций (силовое поле MM3). Величины $J_{C,H}$ констант были измерены с помощью J-НМВС и J-resolved экспериментов ЯМР. Для определения пространственной формы молекул нами были рассчитаны параметры асферичности.



Было показано, что в случае линейных олигосахаридов конформационные свойства дисахаридных фрагментов не зависят критически от их положения в цепи и от длины цепи. Для этих молекул характерно существование в спиралевидных конформациях. В случае циклических олигоглюкозаминов анализ рассчитанных распределений асферичностей молекул показал значительные различия в их подвижности. Это было подтверждено исходя из анализа экспериментальных величин $J_{C,H}$ и $J_{H,H}$ констант. Увеличение подвижности больших циклов является следствием изменения конформационных свойств дисахаридных фрагментов молекул. В тоже время, конформации дисахаридных фрагментов в больших циклах (гекса- и гептасахариды) близки конформациям дисахаридных фрагментов в линейных молекулах.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых МК-5970.2008.3 и Российского фонда фундаментальных исследований (№07-03-00603-а).

Создание новой рекомбинантной белковой конструкции для ферментативного гидролиза бета-галактозидов

Д.В. Гришин, А.В. Никитин, В.В. Бирюков

Московский государственный университет инженерной экологии Федерального агентства по образованию РФ, г. Москва.

Электронная почта: gdv23@rambler.ru

Недостаточность фермента β -галактозидазы (лактазы), расщепляющей лактозу молока имеет особое значение в раннем детстве, так как дисахарид лактоза, содержащийся в молоке является основным источником галактозы, которая в свою очередь участвует в синтезе галактоцереброзидов, необходимых для нормального развития ЦНС и сетчатки глаза, вследствие чего уменьшение количества лактозы и производных её гидролиза нежелательно, особенно в детском возрасте. Между тем почти 20% населения Земли стабильно подвержено синдрому мальабсорбции (СМА), который выражается, в частности, в лактозонепереносимости и сопряженных с этим явлением последствиях [1]. Наиболее радикальным и эффективным способом лечения и профилактики СМА, является использование лактаз для создания безлактозных молочных продуктов, либо приём ферментных препаратов, расщепляющих лактозу вместе с молоком. Однако, в случае используемых в настоящее время мезофильных β -галактозидаз, наблюдается быстрая инактивация фермента как при проведении производственных процессов получения безлактозных продуктов при повышенной температуре (50-70°C), так и из-за его деградации протеазами и быстрого уноса, вследствие физиологической перистальтики желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Принципиально новым подходом к получению препаратов β -галактозидаз с улучшенными характеристиками является внедрение методов генной инженерии, позволяющих создавать β -галактозидазы, обладающие повышенной термостабильностью и способностью к самостоятельному аффинному связыванию с биологически совместимыми субстратами (декстран), что не только значительно облегчало бы процесс очистки ферментов но и экранировало бы их от разрушающего воздействия протеаз ЖКТ. Создание подобных ферментных препаратов становится возможным при использовании штаммов бактерий, трансформированных плазмидной ДНК, несущей ген β -галактозидазы с улучшенными свойствами.

Распространённая на сегодняшний день концепция разработки слитных генно-инженерных конструкций [2], позволила нам предложить стратегию получения химерного рекомбинантного белка, обладающего одновременно двумя важными свойствами: лактазной активностью и способностью к самостоятельному аффинному связыванию с декстраном.

В процессе данной работы была создана рекомбинантная плазмидная ДНК (pGD-10) обеспечивающая экспрессию белка ДСД-сп- β -ГАЛ (схема №1) содержащего каталитическую последовательность термостабильной бета-галактозидазы из термофильного микроорганизма *Thermoanaerobacter Ethanolicus* (β -ГАЛ) и декстрансвязывающий домен из *Leuconostoc mesenteroides* (ДСД) в клетках *E.coli*, кроме того, был получен штамм-продуцент *E.coli*, а также изучены физические свойства и ферментативная активность белка ДСД-сп- β -ГАЛ в лизатах клеток.



Схема. 1. Общая схема организации химерных генно-инженерных конструкций (P – промотор, SD – сайт Шайна-Дальгарно, ДСД, β -Гал – последовательности ДНК, кодирующие декстрансвязывающий домен и β -галактозидазу соотв., T – терминирующий кодон).

1. К.С. Ладодо. Руководство по лечебному питанию детей // М., 2000. 384 с.
2. Глик Б., Пастернак Дж., Молекулярная биотехнология (принципы и применение) // «Мир», Москва, 2002, с.с. 158-330.

Динамика роста и биосинтеза полифенолов в *rolB*-трансгенной культуре Маакии амурской *Maackia amurensis*

О.В. Грищенко¹, К.В. Киселев¹, Чернодед¹, М.В. Веселова², В.П. Булгаков¹

¹Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: crab_ol@mail.ru

Маакия амурская *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. – это единственный древесный вид сем. Бобовых на Российском Дальнем Востоке. Комплекс полифенолов (ПФК) из ядровой древесины данного реликтового вида обладает выраженным гепатопротекторным действием; на его основе разработан эффективный препарат Максар (Саратиков и др., 2005). Ранее получена культура клеток маакии амурской. Содержание ПФ в клетках составляет $1,44 \pm 0,18\%$ от сухого веса клеток по результатам нескольких экспериментов. (Fedoreyev et al, 2008). Установлено, что основные вторичные метаболиты в клетках маакии амурской – изофлавоноиды и их гликозиды: генистин, 4'-О-β-D-гликопиранозилгенистин, дайдзин, 7-О-β-D-гликопиранозилкаликозин, 6"-О-малонилононин, 6"-малонил-3-О-β-D-глико--6,8-дигидромаакиаин, 6"-малонил-3-О-β-D-гликопиранозилмаакиаин, 6"-малонил-3-О-β-D-гликопиранозилмедикарпин. Содержание данных веществ в клетках составляет от 0,1% и выше от сухой биомассы клеток.

С целью увеличения содержания ПФ в культуре клеток маакии методом трансформации генами *rol* агробактерий *Agrobacterium rhizogenes* получены *rolB*-трансгенная (МВ) и векторная культура маакии (MV). Последняя содержит только ген устойчивости к антибиотику *nptII* (Bulgakov et al, 2002). Трансгенность культур доказана геноспецифическим ПЦР по генам *rolB* и *nptII*. Проведены эксперименты по динамике роста и биосинтеза ПФ в MV и МВ культурах маакии. Срок культивирования составил 60 суток с интервалом определения параметров продуктивности культур каждые 10 дней. Полученные результаты представлены в табл. 1 и 2. Согласно им, культура MV обладает длительным периодом покоя, активный рост наблюдается только с 30-го дня до конца эксперимента. Содержание ПФ в течение периода покоя (1 месяц) остается низким, и только после 40 дней начинается активное увеличение их содержания и продуктивности культуры, достигающее наибольшего значения на 50-й день: 1,67% от сухой массы клеток и 101,36 мг/л среды. Далее происходит активное уменьшение содержания ПФ (1,08%; 89,32 мг/л среды на 60-й день).

RolB-трансгенная культура характеризуется активным ростом уже на 10-й день эксперимента. Интересно, что трансгенная культура клеток накапливает сухую биомассу значительно быстрее векторной, тогда как скорость накопления сырого веса клеток почти одинакова у обеих культур. Содержание ПФ в культуре МВ уже на 30 день составляет 1,67% от сухой массы клеток, увеличивается до значения 2,06% на 50 день, и остается на уровне 2,0% до конца культивирования. Продуктивность культуры МВ на 30-й день составляет 100 мг/л среды, и увеличивается до 202 мг/л среды в конце пассажа. Состав ПФ МВ и MV культур идентичен, но процентное содержание различается. Основные изменения показаны в Табл. 2.

Таким образом, трансформация геном *rolB* *A. rhizogenes* клеток маакии привела к активации роста и биосинтеза вторичных метаболитов и, в целом, увеличила продуктивность культуры клеток в 2 раза.

1. Саратиков А.С., Чучалин В.С., Ратькин А.В., Ратькин Е.В., Федореев С.А., Булгаков В.П. // Эксп. клин. фармакол. 2005. Т. 68. С. 51-54.

2. Fedoreyev A.S., Bulgakov V.P., Grishchenko O.V., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. // J.Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 7023-7031.

3. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // [J. Biotechnol.](#) 2002. V. 97(3). P.213-221.

Приложение:

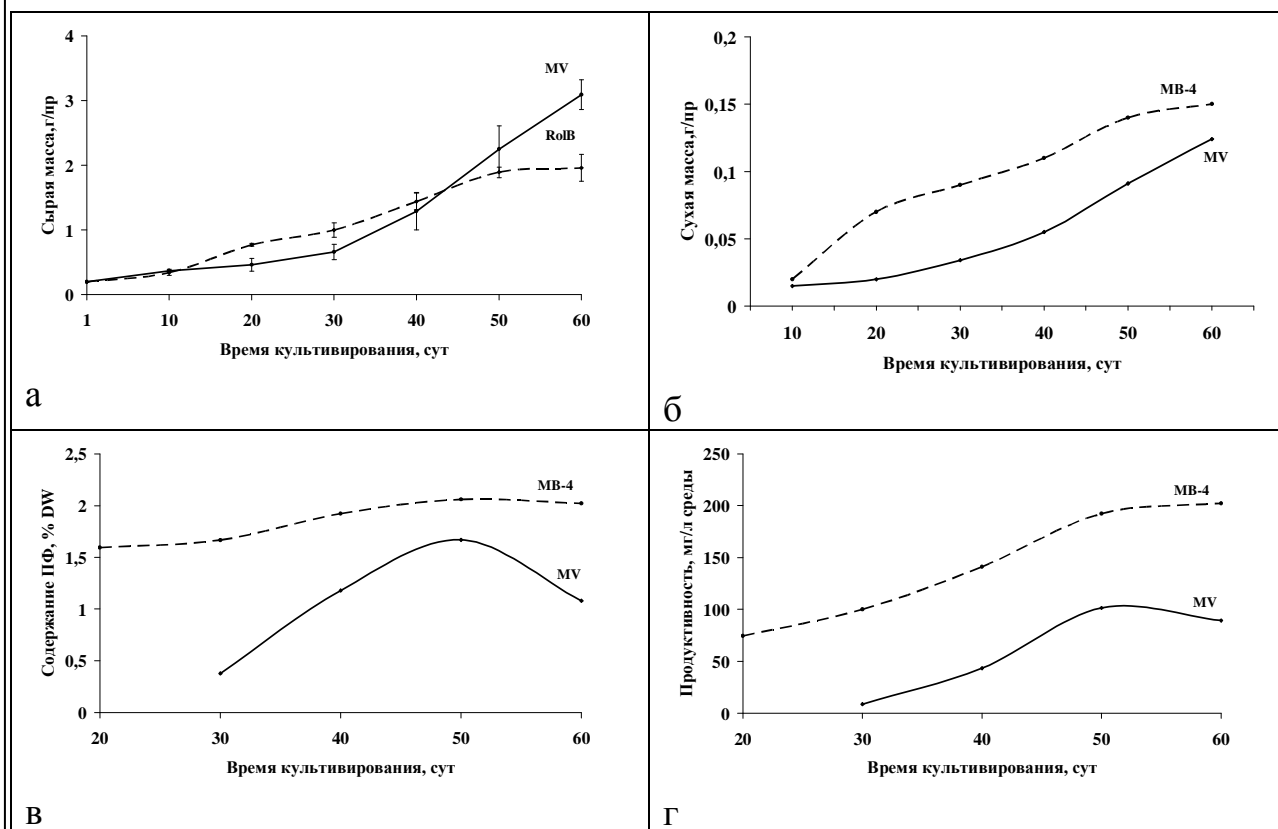


Таблица 1. Динамика изменения сырой биомассы, суммы ПФ и продуктивности культур MV и MB маакии амурской. а - сырая масса; б - сухая масса; в - сумма ПФ; г-продуктивность синтезов ПФ.

Культуры	MV				MB				
	Вещ-ва	30 дн.	40 дн.	50 дн.	60 дн.	30 дн.	40 дн.	50 дн.	60 дн.
1.		0,069	0,116	0,148	0,123	0,069	0,088	0,09	0,088
2.		0,048	0,155	0,125	0,075	0,030	0,032	0,032	0,021
3.		0,018	0,039	0,055	0,031	0,082	0,157	0,169	0,155
4.		-	0,024	0,046	0,032	0,091	0,101	0,111	0,104
5.		0,071	0,204	0,311	0,157	0,237	0,281	0,264	0,244
6.		0,029	0,075	0,14	0,083	0,208	0,224	0,193	0,158
7.		0,020	0,148	0,203	0,180	0,432	0,478	0,547	0,607
8.		0,013	0,132	0,162	0,098	0,200	0,183	0,176	0,185

Таблица 2. Состав и процентное содержание от сухой биомассы клеток ПФ векторной (MV) и трансгенной (MB) культур маакии амурской. Изофлавоны и их гликозиды:

1.- генистин; 2.- 4'-O-β-D-гликопиранозилгенистин; 3.- дайдзин; 4.- 7-O-β-D-гликопиранозилкаликозин; 5.- 6"-O-малонилононин;

Гликозиды птерокарпанов:

6. - 6"-малонил-3-O-β-D-глико--6,6а-дигидромаакиаин;

7.- 6"-малонил-3-O-β-D-гликопиранозилмаакиаин;

8.- 6"-малонил-3-O-β-D-гликопиранозилмедикарпин.

**К вопросу о механизме рострегулирующего действия
циклопентановых β, β' -трикетонов**

Е.А. Демина¹, Л.Я. Тищенко¹, О.П. Шестак¹, Г.Н. Лихацкая¹, Е.В. Трифионов², М.М. Анисимов¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

²Институт автоматизации и процессов управления, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: dminae@mail.ru

В более ранних исследованиях нами было показано, что природные циклопентановые β, β' -трикетоны и их синтетические аналоги регулируют рост растений в зависимости от концентрации: до 10 мкг/мл не влияют или стимулируют рост корня проростков огурца *Cucumis sativus* и гречихи *Fagopyrum esculentum*¹, выше 10 мкг/мл – ингибируют рост корня².

Однако при некотором ингибировании роста корня проростков под действием исследуемых веществ происходит усиление защитных функций проростков. В корнях проростков происходит накопление транспортных аминокислот глутаминовой и аспарагиновой, амидов глутамин и аспарагин, аминокислот орнитинового цикла и самого пролина, а также аланина и γ -аминомасляной кислоты, которые обеспечивают устойчивость растений к стрессовым факторам³. При стимулировании роста корня проростков *F. esculentum* под влиянием трикетонов происходило увеличение содержания глутаминовой аминокислоты и глутамин, «стрессовой» γ -аминомасляной кислоты и предшественника пролина – аргинина.

Такие изменения содержания свободных аминокислот в проростках свидетельствуют в пользу ретардантного механизма действия циклопентановых β, β' -трикетонов. Регуляторы роста растений – ретарданты влияют на биосинтез гормонов гиббереллинов и, тем самым, на все ростовые процессы растений: растения становятся низкорослыми, но крепкими, увеличивается облиственность, фотосинтетическая активность, корневая система становится более разветвленной, что обеспечивает приток воды и минеральных солей, в результате повышается устойчивость растений к стрессам и увеличивается урожайность.

Проведенные теоретические исследования показали возможность взаимодействия циклопентановых β, β' -трикетонов с активным центром фермента гиббереллин-3 β -диоксигеназы (ЕС 1.14.11.15). Ингибирование активности этого фермента другими ретардантами приводит к остановке биосинтеза на стадии 3 β -гидроксилирования неактивного гиббереллина ГА₂₀ в биоактивный ГА₁⁴.

В связи с этим, одним из возможных механизмов, объясняющих влияние изученных циклопентановых трикетонов на рост и биохимические процессы в корнях проростков *Cucumis sativus* и *Fagopyrum esculentum*, является, по-видимому, взаимодействие трикетонов с активным центром фермента гиббереллин-3 β -диоксигеназы (ЕС 1.14.11.15), принимающей участие в биосинтезе фитогормонов гиббереллинов.

1. Демина. Е.А., Шестак О.П., Новиков В.Л., Анисимов М.М. // Химия растит. сырья. 2008. №3. С. 107-110.

2. Новиков В.Л., Шестак О.П., Логачев В.В., Анисимов М.М. // Раст. ресурсы. 2003. Т. 39, Вып. 4. С. 87-94.

3. Demina, E.A.; Tishchenko, L.Ya.; Shestak, O.P.; Novikov, V.L.; Anisimov, M.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. P. 87–92.

4. King R.W., Junttila O., Mander L.N., Beck E.J. // Physiol. Plant. 2004. V. 120, No. 2. P. 287-297.

Выделение, идентификация и свойства кальпонин-подобного белка запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus*

А.В. Добржанская, Г.Г. Матусовская, О.С. Матусовский, А.Г. Реваковская,
Н.С. Шелудько

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: dobrzhanskaya@gmail.com

Согласно классической модели скользящих нитей, мышечное сокращение является результатом перемещения миозиновых толстых нитей относительно тонких нитей актина. Сигналом для сокращения служит повышение концентрации Ca^{2+} , которое активирует либо толстые нити (миозиновый тип регуляции), либо тонкие нити (актиновый тип регуляции). В некоторых мышцах одновременно реализованы оба типа Ca^{2+} -регуляции. К таким мышцам относятся мышцы двусторчатых моллюсков, способные не только к активному, но и к пассивному запирающему сокращению, при котором мышца поддерживает в отсутствие Ca^{2+} высокое напряжение при очень низком расходе энергии АТФ. Ранее нами была предложена гипотеза «актин-твитчиновых сшивок», согласно которой в основе молекулярного механизма запирающего сокращения лежит образование сшивок между толстыми и тонкими нитями посредством гигантского белка твитчина. Мы показали, что образование этих сшивок влечет за собой конформационные изменения тонких нитей и предположили, что тонкие нити играют важную регуляторную роль в запирающей функции.

При исследовании состава и свойств тонких нитей запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* нами был обнаружен и выделен белок с молекулярной массой 40 кДа. С помощью масс-спектрометрического анализа была выявлена его гомология с белком кальпонином (34 кДа), присутствующим в различных тканях позвоночных животных. Функция кальпонины неизвестна. Тестирование свойств данного белка показало его сходство с кальпонином гладких мышц позвоночных животных. Кальпонин-подобный белок из мидии, так же как и кальпонин гладких мышц позвоночных, способен взаимодействовать с фибриллярным актином, он ингибирует MgATF азную активность актомиозина, устойчив к термической обработке и способен фосфорилироваться эндогенными киназами. Кроме того, мы показали, что кальпонин-подобный белок не принимает участие в Ca^{2+} -зависимой регуляции тонких нитей и, более того, ингибирует эту регуляцию.

Оказалось, однако, что присутствие кальпонин-подобного белка в составе тонких нитей запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* не является обязательным. Мы разработали два метода выделения тонких нитей из мышц мидии, которые позволяют получить тонкие нити как содержащие, так и не содержащие этот белок. Есть основания предполагать, что различия между этими методами обусловлены уровнем фосфатазно-киназной активности в процессе выделения. По-видимому, фосфорилирование кальпонин-подобного белка приводит к его откреплению от тонких нитей, что, в свою очередь, приводит к снятию ингибирующего влияния белка на тонкие нити.

Мы полагаем, что кальпонин-подобный белок не является постоянным компонентом тонких нитей запирающей мышцы мидии. Взаимодействие этого белка с тонкими нитями, скорее всего, регулируется его фосфорилированием/дефосфорилированием посредством независимой регуляторной системы, активируемой внеклеточным сигналом, отличным от такого в случае Ca^{2+} -зависимой регуляции тонких нитей. Неизвестная функция этого белка реализуется при его ассоциации с тонкими нитями.

Авторы приносят благодарность А. Собешки (Institute for Biomedical Aging Research, Life Science Center, Austrian Academy of Sciences) за проверку способности кальпонин-подобного белка мидии к фосфорилированию.

Исследование тяжелой ЧМТ у крыс методами МРТ и ЯМР

К.А. Дроздов¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: drovsh@yandex.ru

Несмотря на то, что в современной медицине уделяется большое внимание терапии при повреждении головного мозга летальность больных с этим заболеванием остается высокой. Черепно-мозговая травма является основной причиной гибели населения в возрастной группе от 20-40 лет. Лечение больных с ЧМТ сопряжено с большим количеством сложностей, при различных формах повреждения мозга требуется различный уход за пострадавшими. В ряде случаев установление истинной тяжести повреждения бывает крайне затруднительно. Например, диагностика тяжести повреждения головного мозга при сочетанной травме имеет ряд особенностей и требует иной подход при оказании первой помощи и лечении. Основываясь на вышесказанном можно утверждать, что развитие новых методов лечения и диагностики пациентов повреждения мозга при черепно-мозговой травме крайне важно и имеет большое практическое значение.

В нашей работе мы изучали мозг крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar в интактном состоянии и после ЧМТ, которую вызывали механически с помощью сконструированной нами установки. За время проведения эксперимента было проведено, более 800 МРТ исследований различными методами и получено более 600 гистологических срезов, в различные сроки после индукции ЧМТ. Так же были получены ЯМР спектры мочи и плазмы крови крыс с тяжелой ЧМТ в первые сутки после нанесения травмы.

Было установлено, что гематома формируется в первые минуты после травмы, после чего объем гематомы практически линейно снижается. Объем отека первые 24 часа нарастает, после чего до 72 часов изменяется не значительно, а от 72 часов к 168 быстро уменьшается в объеме.

К 20-ым суткам гематомы превышающие $0,5\text{см}^3$ преобразуются в кисты, при этом в значительной мере увеличивается время T1 релаксации, что позволяет на T1-взвешенных томограммах почти полностью погасить сигнал от всего мозга и добиться отображения только кисты. По предварительным данным это вызвано значительно меньшим содержанием кислорода внутри кисты и повышением соединений содержащих кетонные группы.

По данным ЯМР спектроскопии было установлено, что при тяжелой ЧМТ у крыс в крови и моче повышается содержание лактатов (продуктов анаэробного гликолиза), а так же глутаматов и глутаминов, что соответствует современным представлениям о течении ЧМТ. Это является доказательством перспективности метода и возможности его дальнейшего использования для диагностики тяжести ЧМТ.

Ааптамины – противораковые вещества из морской губки *Aaptos sp.*

С.А. Дышловой, С.Н. Федоров, Л.К. Шубина, А.И. Калиновский, А.С. Савина, В.А. Стоник
 Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
 Электронная почта: dishlovoy@mail.ru

Морские губки являются богатым источником биологически активных природных соединений, принадлежащих к разным структурным группам.

Из водно-этанольного экстракта Вьетнамской морской губки *Aaptos sp.*, в результате серии хроматографий с проверкой биологической активности всех получаемых фракций, нами было выделено 4 соединения, ответственных за противоопухолевые свойства экстракта этой губки. Выделенные соединения принадлежат к структурной группе ааптаминов – 1Н-бензо[de]-1,6-нафтиридинов. Среди них ранее известные ааптамн (1), 9-деметилоксияаптамин (2), изоааптамин (3), а также одно новое соединение 3-(N-морфолинил)-9-деметилоксияаптамин (4) (рис. 1). Следует отметить, что присутствие морфолинильного фрагмента в структуре морских природных соединений было зафиксировано впервые.

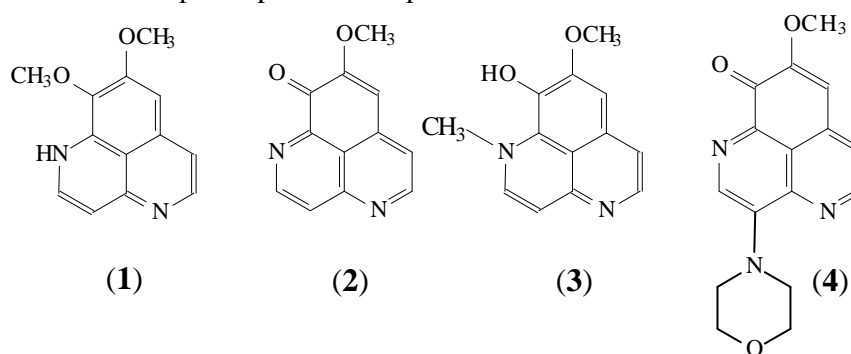


Рис. 1. Ааптаминовые алкалоиды морской губки *Aaptos sp.*

Противоопухолевые цитотоксические и канцерпревентивные свойства соединений (1)-(4) были исследованы с помощью MTS-метода и метода мягкого агара соответственно.

Наибольшую цитотоксическую активность проявляет соединение (2), немногим менее активно (3). Соединения (1) и (4) проявляют значительно более слабую цитотоксическую активность. Вещество (1) на порядок более активно по отношению к клеткам промиелоцитарной лейкемии (HL-60), по сравнению с другими линиями опухолевых клеток человека. В то же время (2) проявило наибольшую цитотоксическую активность по отношению к клеткам промиелоцитарной лейкемии (HL-60), рака молочной железы (MDA-MB-231), нейробластомы мыши (Neuro2a) и мышинных эпителиальных клеток (JB6 P⁺ Cl41). (3) и (4) были наиболее активны против клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) и нейробластомы (Neuro2a).

Устойчивость клеток JB6 Cl41 DNM-ERK2 B3 mass1 и JB6 Cl41 DNM-p38 G7 к цитотоксическому действию веществ (1) и (2) по сравнению в нормальными клетками JB6 P⁺ Cl41 говорит о том, что сигнальные пути, идущие через киназы ERK и p38 играют важную роль в процессе индуцируемой этими соединениями гибели клеток.

Было показано, что вещества (1) и (2) ингибируют p53-зависимую транскрипционную активность в цитотоксических концентрациях. Это говорит о том, что производимый цитотоксический эффект носит p53-независимый характер и вещества могут быть использованы для лечения p53-дефицитных типов рака (таких, как например HL-60), устойчивых ко многим медикаментам.

Исследования канцерпревентивных свойств соединений (1), (2), (3) и (4) показало, что вещества способны ингибировать злокачественную трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl 41 в концентрациях, меньше цитотоксических в 20, 4, 10 и 10 раз соответственно, и поэтому могут быть использованы как основы для создания предотвращающих развитие рака препаратов.

Разработка технологии извлечения окрашивающих и биологически активных веществ из шелухи гречихи

А.М. Заболотная, А.Е. Фаттахова, В.А. Реутов
Дальневосточный государственный университет
Электронная почта: amzabolotnaya@rambler.ru

Одним из источников натуральных красителей, обладающих целым рядом преимуществ по сравнению с их синтетическими аналогами, являются отходы переработки растительного сельскохозяйственного сырья. Основная масса многотоннажных отходов переработки гречихи (плодовые оболочки, лузга, солома) не находит промышленного применения в России. Основными направлениями утилизации данного отхода являются их сжигание, использование в качестве топлива для котельных установок, наполнителя для подушек, упаковки для фруктов и хрупких товаров, кормовой добавки. Кроме того, существует ряд разработок, направленных на переработку отходов гречихи – получение окрашивающих и дубильных веществ, масел, сорбентов, биологически активных веществ и др. Для создания комплексной схемы переработки этих отходов необходимы данные зависимости состава продуктов переработки от химического состава сырья, от сорта и места произрастания гречихи, а также физических и химических условия переработки сырья, которые еще недостаточно изучены.

В результате ряда исследовательских работ [1-3] было установлено, что в гречневой шелухе содержатся ценные биологически активные и окрашивающие вещества, такие как полисахариды, полифенолы (в т.ч. флавоноиды), аминокислоты, липиды и белково-полисахаридные комплексы. В рамках данной работы проведена оценка основных технологических параметров извлечения окрашивающих и биологически активных веществ из гречневой шелухи и подбор оптимальных условий проведения процесса.

Было исследовано экстрагирование окрашивающих веществ спиртом и водой в различных условиях с использованием различных методов интенсификации процесса. В зависимости от условий извлечения выход флавоноидов при однократном экстрагировании в пересчете на рутин составил от 0,07 до 0,40 % от сухой массы шелухи. Это соответствует степени извлечения флавоноидов от 9 до 56 %. Увеличение кратности экстрагирования позволяет повысить степень извлечения целевых компонентов на 30-40 %.

При исследовании влияния методов активации на процессы экстрагирования окрашивающих веществ шелухи гречихи было установлено, что наиболее значительное влияние на процесс оказывают степень измельчения шелухи и интенсивность перемешивания взвеси шелухи в экстрагенте. Совершенно неожиданно было обнаружено аномальное влияние ультразвуковой активации на процесс экстрагирования. Применение ультразвуковой обработки совместно с механическим перемешиванием привело, против ожидания, к заметному снижению степени извлечения целевых компонентов по отношению к процессу, проводимому в аналогичных температурных условиях при обычном механическом перемешивании. Такое аномальное влияние ультразвука не может быть объяснено исходя из теоретических представлений об ультразвуковой активации и, по-видимому, связано с тем, что лимитирующей стадией процесса является не стадия перехода вещества из гранулы шелухи в жидкую фазу, а стадия переноса вещества в объеме жидкости.

1. Земнухова Л.А., Исай С.В., Шкорина Е.Д., Бусарова Н.Г., Кафанова Т.В. // Журнал прикладной химии. 2006. Т. 79. Вып 3. С. 1554-1557.

2. Земнухова Л.А., Колзунова Л.Г., Шкорина Е.Д. // Журнал прикладной химии. 2006. Т. 80. Вып 6. С. 1032-1036.

3. Туева И.А., Дмитрук С.Е., Калинкина Г.И., Сальникова Е.Н. // Материалы II Всероссийской конференции. 21–22 апреля 2005 г. 2005. Книга I. С. 344-348.

Анализ филогенетических отношений культурных и диких представителей рода горох (*Pisum* L.) на основании нуклеотидных последовательностей генов гистона H1

О.О. Зайцева, О.Э. Костерин, В.С. Богданова
Институт цитологии и генетики СО РАН
Электронная почта: olgazaytseva@bionet.nsc.ru

В роде горох (*Pisum*) выделяют три вида - *P. fulvum*, *P. abyssinicum* и *P. sativum*. О. Э. Костерин и В. С. Богданова на материале 89 образцов диких и культурных форм провели анализ трех маркеров, находящихся в разных клеточных геномах [1], в дальнейшем набор исследованных образцов был расширен. Было обнаружено четыре наиболее часто встречаются сочетания аллелей (условно называемые А, В, С и D), причем сочетание А является предковым для рода, а остальные сочетания выводятся из него путем последовательных мутаций у *P. sativum*.

В настоящее время таксономия рода *Pisum* достаточно запутана и несовершенна, поскольку горох является преимущественно самоопылителем, а его популяции локальны. В связи с этим возникает необходимость дополнительных исследований, в том числе с привлечением молекулярных маркеров. Данная работа посвящена реконструкции филогенетических отношений в пределах рода *Pisum* по гену *His5* субтипа 5 гистона H1. Гистон H1 проявляет значительную вариабельность, вплоть до внутривидового полиморфизма. На настоящий момент у гороха известно 7 неаллельных субтипов гистона H1.

У 50ти образцов гороха были определены нуклеотидные последовательности гена *His5*, на основе которых построены филогенетические деревья. Филогенетические реконструкции согласуются с результатами вышеупомянутого анализа трех маркеров [1] и также указывают на более раннее эволюционное происхождение линии А. На большинстве реконструкций отчетливо выделяются два кластера – в состав первого входят представители диких форм гороха и линий А и С, а также один носитель редких сочетаний аллелей маркеров, в состав второй – дикие и культурные представители вида *P. sativum*, преимущественно представляющие линии В и D, среди них также содержатся два представителя линии А и 1 образец с редким сочетанием маркеров. Поскольку представители видов *P. fulvum* и *P. abyssinicum* находятся в составе первого кластера, подтверждается гипотеза о дивергенции этих видов до формирования линий В и D. Образцы, относящиеся к виду *P. fulvum* обособляются в отдельную ветвь с bootstrap-поддержкой 64%. Образцы, представляющие вид *P. abyssinicum*, также кластеризуются вместе, bootstrap-поддержка этого ветвления составляет 69%.

1. Kosterin O.E., Bogdanova V.S. // Genet. Resour. Crop Evol. 2008. V. 55. P. 735-755.

Влияние дигидрокверцетина на морфофункциональное состояние почки при экспериментальной гипергликемии

А. С. Зверев, Н.С. Сержанова, Н. П. Красавина
Амурская государственная медицинская академия
Электронная почта: zver-96@mail.ru

В настоящее время сахарный диабет (СД) является одной из основных причин высокой заболеваемости, инвалидизации и смертности населения. Комитет экспертов ВОЗ в 1981 г. определил СД как синдром хронической гипергликемии. При хронической гипергликемии часто развиваются осложнения, среди которых ведущим является почечная недостаточность, причины развития которой окончательно не установлены. Проблема поиска и разработки новых препаратов, влияющих на основные звенья патогенеза СД, является очень актуальной и представляет перспективный подход к терапии и профилактики его осложнений. Дигидрокверцетин (ДКВ) - относится к группе флаванолов и отличается широким спектром биологической активности, он обладает антиоксидантными свойствами и капилляропротекторной активностью.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на трех группах белых крыс (самцах). Первая группа - интактные. Вторая - животные в течение 8 недель ежедневно получали глюкозу: перорально в дозе 1,2 гр. и внутривентриально - 0,7 гр. Третья группа - на фоне созданной гипергликемии получала перорально препарат ДКВ в дозе 6 мг. Контроль содержания глюкозы в крови определялся глюкометром one touch BASIC PLUS. Структуру почки изучали общеморфологическими и гистохимическими методами. Биохимически определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и в ткани почки. Уровень гипергликемии определяли через 4 недели, он составил у животных натощак - 5,9 ммоль/л; через 45 мин., после введения глюкозы - 7,1; а через 60 мин. - 11,5 ммоль/л. К восьмой неделе эксперимента показатель глюкозы в крови натощак был равен 6,4 ммоль/л, при этом тенденция к повышению после приема глюкозы была более выражена. В условиях данного эксперимента сохраняется общий план строения почки, но изменяется локализация значительного числа почечных телец корковых нефронов, часть из них резко уменьшены и деструктивно изменены. Достаточно часто выявляется расширение полости капсулы. Выявляется высокая ШИК-позитивная реакция в базальных мембранах капсулы и очаговое увеличение нейтральных полисахаридов и гликозаминогликанов в почечном клубочке. Интерстициальная ткань вокруг большинства почечных телец уплотнена. Просвет проксимальных канальцев расширен, эпителий более низкий, чем у интактных животных, в просвете выявляются бесструктурные оксифильные массы. На фоне экспериментальной гипергликемии применение ДКВ приводит к достоверному снижению уровня глюкозы в сыворотке крови. При этом в сыворотке крови и ткани почки достоверно снижаются показатели диеновых конъюгатов и повышается уровень витамина Е. Большая часть почечных телец по морфологии близка к норме. Просвет капсулы незначительно расширен, либо в пределах нормы. Периваскулярное пространство не увеличено. В просвете проксимальных канальцев умеренное количество бесструктурных масс. Высокая очаговая активность на ШИК - положительные вещества сохраняется в апикальной части эпителия проксимальных канальцев и базальных мембранах. Содержание гликозаминогликанов несколько увеличено в наружном листке капсулы и сосудистом клубочке. Довольно однородная реакция на гликозаминогликаны выявляется в базальной мембране собирательных трубочек и в интерстиции мозгового вещества.

Как показали наши исследования, ДКВ - как вещество, обладающее высокой степенью биологической активности, оказывает целую гамму положительных эффектов на обменные реакции и динамику различных патологических процессов в почках в условиях гипергликемии.

Симбиотические системы Artropoda-Wolbachia

Ю.Ю. Илинский¹, Р.А. Быков², А.Ю.Цидулко², И.К. Захаров^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики, ²Новосибирский государственный университет
Электронная почта: paulee@bionet.nsc.ru

Симбиотические системы «Artropoda-Wolbachia» представляют исключительный интерес для эволюционной биологии и генетики. Бактерия *Wolbachia* это альфапротеобактерия, которая трансвариально передается в поколениях многих представителей членистоногих и некоторых нематод (Werren et. al. 1995). Столь значительный эволюционный успех бактерии связывается со способностью индуцировать репродуктивные аномалии: партеногенез, феминизацию, андроцид и цитоплазматическую несовместимость, которые обеспечивают распространение инфицированной цитоплазмы в популяции вида-хозяина. Кроме того, известны факты мутуализма, в результате которых возникает селективное преимущество особей вида-хозяина, содержащих эндосимбионта, по сравнению с неинфицированными особями. К настоящему моменту остается неизвестным, какие молекулярные механизмы вовлечены во взаимодействие *Wolbachia* и вида-хозяина.

На основе анализа тропической фауны насекомых высказано предположение, что более половины всех ныне существующих видов насекомых на Земле могут быть инфицированы *Wolbachia* (Hilgenboecker et. al. 2008). В данном отношении фауна беспозвоночных умеренных широт и, в частности, территории РФ оказывается слабо изученной.

В докладе представлены результаты оригинальных исследований симбиотической системы *Drosophila melanogaster-Wolbachia* (Илинский, Захаров 2007а,б; Илинский, Захаров 2009; Вайсман и др. 2009) а также обсуждаются вопросы, связанные с поиском симбиотических ассоциаций членистоногие-*Wolbachia* и возможностью использовать эндосимбионта в качестве генетического маркера для установления филетических связей между близкими видами насекомых, популяционного разнообразия видов-хозяев и характера симбиотических взаимоотношений. Кроме того, обсуждаются перспективы биотехнологии на основе эндосимбионта *Wolbachia*, направленные на регулирование популяционной численности экономически значимых видов насекомых, а также использования бактерии в качестве фактора трансгенеза.

1. Werren J., Guo G., Windsor D. Distribution of *Wolbachia* in neotropical Artropods. // Proceeding of Royal Society London. Ser. Biol. Sci. 1995. V. 262. P. 147-204.
2. Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. // FEMS Microbiol Lett. 2008. V. 281 №2. P 215–220.
3. Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Характеристика инфицированности цитоплазматическим эндосимбионтом *Wolbachia* популяции *Drosophila melanogaster* Умани // Доклады Академии наук. 2007а. Т. 413. №4. С. 561-563.
4. Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Эндосимбионт *Wolbachia* в евразийских популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2007б. Т. 43. №7. С. 905-915.
5. Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Цитоплазматическая несовместимость у *Drosophila melanogaster*, обусловленная различными генотипами *Wolbachia*. // Экологическая генетика. 2009. Т.7. №2. С. 11-18.
6. Вайсман Н.Я., Илинский Ю.Ю., Голубовский М.Д. Популяционно-генетический анализ продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*: сходные эффекты эндосимбионта *Wolbachia* и опухолевого супрессора *lgl* в условиях температурного стресса. // Журнал общей биологии. 2009. Т. 70. №5 С 425-434.

Исследование механизмов регуляции объема главных клеток эпителия собирательных трубок почки

А.В. Иляскин^{1,2}, Е.И. Соленов^{1,2}, Г.С. Батурина¹, Л.Е. Каткова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Электронная почта: sashkail@mail.ru

Главные клетки собирательных трубок почки подвергаются значительным колебаниям осмотического давления канальцевой жидкости. Для сохранения жизнеспособности в гипотонической среде данные клетки должны обладать эффективным механизмом регуляторного снижения объема (RVD). Реакция RVD осуществляется благодаря выходу из клетки осмолитов, по мнению многих авторов, K^+ и Cl^- [1,2]. Изменение концентраций ионов снаружи и внутри клетки может приводить к изменению трансмембранного потенциала.

В настоящей работе исследовалась зависимость между набуханием клетки при действии гипотонической среды и изменением трансмембранного потенциала. Для изучения изменения объема клетки в процессе реакции на осмотический шок применяли метод, основанный на эффекте гашения флуоресцентного красителя Calcein белками цитоплазмы, разработанный нами ранее [3]. Детекция изменения трансмембранного потенциала осуществлялась с помощью электрохромного красителя di-4-ANNEPS [4]. Установлено, что гипотонический шок сопровождается значительной деполяризацией мембраны. Измерения внутриклеточной концентрации Na^+ с помощью флуоресцентного красителя Sodium green показали, что гипотонический шок при неизменной концентрации ионов в омывающем растворе вызывает кратковременное увеличение концентрации Na^+ внутри клетки, совпадающее по времени с фазой резкого набухания клетки. Для выяснения роли механочувствительных каналов в развитии деполяризации клетки проводились измерения трансмембранного потенциала в присутствии блокаторов: Gd^{3+} и стрептомицина [5,6]. Регрессионный и корреляционный анализ начальных участков кривых трансмембранного потенциала выявил ослабление деполяризации в присутствии данных агентов (коэффициент линейной регрессии контроля: $-0,07$ ($r = -0,84$), с Gd^{3+} : $-0,03$ ($r = -0,54$), со стрептомицином: $-0,02$ ($r = -0,46$)). Анализ видеоизображений поведения клеток при шоке и уровня флуоресценции Calcein при возвращении в изотоническую среду показал, что объем клетки снижается по сравнению с начальным. Поэтому можно предположить, что в процессе RVD клетка теряет значительную часть осмолитов.

Таким образом, деполяризация клеток, происходящая во время гипотонического шока, может быть вызвана активацией механочувствительных ионных каналов и повышенным входом Na^+ внутрь клетки. Деполяризация клеток может облегчать выход осмолитов (например, ионов K^+) из клетки и способствовать реакции RVD.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ (гранты 08-04-00541, 09-04-00197), «Ведущие научные школы» НШ-1647.2008.4

1. Lang F., Busch G.L., Völkl H. //Cell. Physiol. Biochem. 1998. V.8. P.1–45;
2. Fu.W., Kuwahara M., Marumo F. //Japanese J Physiol. 1995. V.45. P.97-109;
3. Solenov E., Watanabe H., Verkman A. S. //Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2004. V.286. P.426–432;
4. Loew L.M., Cohen L.B., Montana V., Salama G. //J. Membr. Biol. 1992. V.130(1). P.1-10;
5. Gannier F., White E., Lacampagne A. //Cardiovascular research. 1994. V.28(8). P.1193-1198;
6. Suleymanian M., Clemo H. //J. Mol. Cell Cardiol. 1995. V.27. P.721-728.

Получение полных нуклеотидных последовательностей генов *STS* из *Vitis amurensis*, кодирующих белок стильбен синтаз

Г.А. Исаева^{1,2}, А.С. Дубровина¹, К.В. Киселев¹

¹Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный государственный университет

Электронная почта: kiselev@biosoil.ru

Ключевую роль в биосинтезе резвератрола – ценного противоопухолевого стильбена, играют белковые продукты генов стильбен синтаз (*STS*). Известно, что виноград является основным источником резвератрола (Tassoni et al. 2005), а содержание резвератрола в *Vitis amurensis* является наибольшим среди представителей в сем. Vitacea (Huang et al., 2001). Ранее с помощью вырожденных праймеров были получены частичные последовательности нескольких генов *STS* (Kiselev et al., 2009). На основе разницы в экспрессии генов *STS* в культурах клеток *V. amurensis* было сделано предположение, что белковые продукты описанных генов *STS* обладают разной активностью в биосинтезе резвератрола (Kiselev et al., 2009). Предполагалось, что белковые продукты генов *VaSTS3* (EU659864), *VaSTS4* (EU659865), *VaSTS5* (EU659866), *VaSTS7* (EU659868) обладали большей активностью в биосинтезе резвератрола, чем *VaSTS1* (EU659862), *VaSTS6* (EU659867). Целью данной работы стало секвенирование нуклеотидных последовательностей генов *STS* из *Vitis amurensis* с целью изучения отличий в структуре белковых доменов. Секвенирование осуществлялось на базе БПИ ДВО РАН, по методике описанной ранее (Kiselev et al., 2009). Так как нуклеотидные последовательности разных генов *STS* близки (90-99%), а геном близкого к *V. amurensis* вида (*V. vinifera*) полностью секвенирован, то на основе известных генов мы подобрали вырожденные праймеры к началу и к концу кодирующей последовательности генов *STS*, которые подходили ко всем известным последовательностям генов *STS* у *V. vinifera*.

На сегодняшний день нами секвенированы полные нуклеотидные последовательности кодирующих белковый продукт генов *STS*: *VaSTS1*, *VaSTS2*, *VaSTS6*, *VaSTS7*. Часть полученных полных последовательностей уже депонирована в генбанк. Например, ген *VaSTS1* (GQ167204), который экспрессируется во всех исследуемых культурах клеток на высоком уровне. К сожалению, до сих пор не получена последовательность генов *VaSTS3*, *VaSTS5*.

Далее сравнивали последовательности активных участков стильбен синтазы (каталитическая группа, *cis*-пептидный виток, место присоединения CoA, активаторный сайт, сайт контроля поликетидной цепи, сайты субстратной специфичности), белковых α -спиралей и β -цепей в выведенных аминокислотных последовательностях генов *VaSTS1* (*VaSTS1a*, *VaSTS1b* – два близких гена), *VaSTS2*, *VaSTS6*, *VaSTS7*.

Оказалось, что по основным активаторным сайтам наблюдается практически 100% гомология. Сильное отличие нами отмечено в 11-й α -спирали (рис.1). Возможно, данное отличие имеет ключевое значение для ферментативной активности белковых продуктов описанных генов *STS*. Далее планируется наработка белковых продуктов полученных генов в *Escherichia coli* и анализ их ферментативной активности по способности синтезировать *in vitro* резвератрол из кумаровой кислоты с участием фермента CoA лигазы.

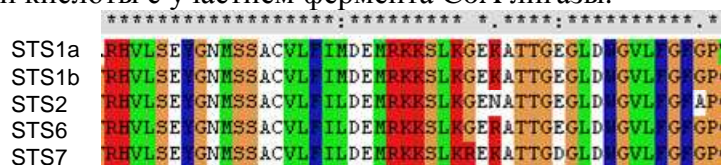


Рис.1. Часть 11-й α -спирали в структуре выведенного белкового продукта генов *STS*. Зона наибольших отличий выделена прямоугольником.

1. Huang K.S., Lin M., Cheng G.F. // Phytochemistry 2001. V. 58. P. 357-362
2. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. P. 647-655
3. Tassoni A., Fornale S., Franceschetti M., Musiani F., Michael A.J., Perry B., Bagni N. // New Phytol. 2005. V. 166 P. 895-905

Оценка интенсивности свободнорадикальных процессов в печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией методом индуцированной биохемиллюминесценции

И.Ю.Искусных, Т.Н.Попова
Воронежский государственный университет
Электронная почта: iskusnykh777@mail.ru

В основе патогенеза при развитии ряда заболеваний печени лежит дисбаланс между гиперпродукцией активных форм кислорода, приводящей к активации процессов свободнорадикального окисления и функционированием системы антиоксидантной защиты организма. Применение метода индуцированной биохемиллюминесценции позволяет оценить уровень протекания свободнорадикальных процессов в организме. В этой связи представляет интерес исследование интенсивности свободнорадикального окисления в печени при хронической алкогольной интоксикации. Показано, что показатели интенсивности хемиллюминесцентного сигнала – светосумма (S) и интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) возросли с 4,99 и 1,8 (норма) до 21,67 и 3,1 (норма) соответственно, что свидетельствует о повышении уровня свободнорадикальных процессов в пораженном органе. При этом, тангенс угла наклона кинетической кривой. ($tg\alpha_2$), характеризующий антиоксидантную активность образцов, увеличивался в 1,9 раза относительно нормы, что связано с возрастанием активности защитных систем организма, осуществляющих контроль за протеканием реакций с участием свободных радикалов.

Фрагментация ДНК в печени крыс в норме, при хронической алкогольной интоксикации и действии мелатонина на фоне патологии

И.Ю.Искусных, Т.Н.Попова, Л.Н.Цветикова, О.С.Мушарова, С.С.Чиховская
Воронежский государственный университет
Электронная почта: iskusnykh777@mail.ru

Развитие многих патологических состояний печени, в частности поражение при алкоголизме, сопровождается гиперпродукцией активных форм кислорода и истощением антиоксидантной системы организма, что может индуцировать апоптоз. Одно из апоптотических событий реализуется в ядре клетки и заключается в фрагментации ДНК. В связи с этим, актуальным вопросом является изучение степени фрагментации ДНК при хронической алкогольной интоксикации и действии мелатонина на фоне патологии. Хроническую алкогольную интоксикацию создавали путем добавления к стандартному рациону 15% этанола регулярно в течение месяца. Мелатонин вводили ежедневно на фоне патологии в концентрации 2 мг на кг веса животного. Эксперимент состоял из экстракции геномной ДНК фенол-хлороформным методом и ее электрофореза в 1% агарозном геле. Показано, что хроническая алкогольная интоксикация сопровождается незначительной фрагментацией ДНК гепатоцитов и их некрозом. Введение мелатонина на фоне хронической алкогольной интоксикации приводит к уменьшению степени фрагментации ДНК. Нельзя исключить, что это происходит благодаря торможению интенсивности свободно-радикальных процессов в условиях реализации антиоксидантного действия мелатонина.

Экспрессия гена силикатеина морской губки *Latrunculia oparinae*, слитого с зеленым флуоресцентным белком в трансгенных клеточных культурах табака

Д.Г. Каменев^{1,2}, Г.Н. Веремейчик¹, Ю.Н. Шкрыль¹

¹Биолого-почвенный институт химии, Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный государственный университет

Электронная почта: salieri.05@mail.ru

Процесс биосилификации, ведущий к формированию спикул у губок, контролируют белки-гомологи цистеиновых протеаз, катепсинов L, получившие название силикатеины (Shimizu *et al.*, 1998). В каталитическом центре этих белков происходит полимеризация соединений кремния. Белок силикатеина, как выделенный из спикулы, так и рекомбинантный, способен конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (TEOS), с образованием кремниевых наноструктур. Целью работы являлось клонирование гена силикатеина, создание вектора для трансформации и изучение свойств трансгенных клеточных культур растений, экспрессирующих рекомбинантный белок.

Ранее мы идентифицировали 4 гена силикатеина в морской губке *Latrunculia oparinae* (*LoSilA1*, *LoSilA2*, *LoSilA3*, *LoSilB*) и изучили уровень их относительной экспрессии. Наши данные показали, что наибольшей экспрессией и, следовательно, наиболее важной среди других силикатеинов функцией обладает ген *LoSilA1*. При помощи метода быстрого определения концов кДНК (RACE) мы установили полную кодирующую последовательность гена *LoSilA1*, которая составила 990 п.н., а так же последовательности 5' и 3' нетранслируемых регионов. Полная кодирующая последовательность была амплифицирована при помощи специальной смеси полимераз Taq и Pfu, обеспечивающей точный синтез длинных фрагментов ДНК, таким образом, чтобы элиминировать стоп-кодон силикатеина. Далее амплифицированный ген был слит с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), и химерный ген был перенесен в состав бинарного вектора, предназначенного для агробактериальной трансформации растений. В полученной конструкции химерный ген *LoSilA1+GFP* находится под контролем вирусного промотера 35S CaMV, синтез белка определяется стартовым кодоном силикатеина, последовательность которого без сдвига рамки переходит на последовательность гена *GFP*, стоп-кодон которого терминирует трансляцию.

Растения табака трансформировали методом агробактериальной трансформации бактерией штамма EHA105, содержащей полученный нами бинарный вектор. Селекцию трансгенных клеток проводили в течение 5 пассажей, по 30 дней каждый, на средах, содержащих селективный антибиотик канамицин. К четвертому пассажиру трансгенные клетки, прошедшие селекцию, активно росли при содержании 1,5 г канамицина на 1 л среды, тогда как обычно используются дозы до 0,1 г на 1 л канамицина. Успешность трансформации была так же подтверждена доказательством экспрессии химерного гена при помощи обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.

Трансгенные каллусные культуры табака, экспрессирующие химерный ген *LoSilA1+GFP*, обладают высокой скоростью роста, прирост сырой биомассы в 1,5-1,8 раза выше по сравнению с нетрансформированной культурой. Трансгенная культура имеет вид рыхлой белоснежной ткани, тогда как нетрансформированная культура компактная и имеет кремовый оттенок. Методом конфокальной микроскопии мы показали, что свечение GFP не имеет строго определенной локализации в трансгенных клетках и обнаруживается как в цитоплазме, так и в ядре. Из трансгенных каллусных культур были регенерированы трансгенные растения. Наибольшее свечение GFP в листьях этих растений было отмечено в устьицах.

Таким образом, нами впервые получены трансгенные растения и трансгенная клеточная культура табака, которые могут являться источником рекомбинантного белка силикатеина.

Численный анализ морфологии прикрепленных *in vitro* гемоцитов морских беспозвоночных

Ю.А.Каретин

Институт биологии моря им.Жирмунского ДВО РАН

Дальневосточный государственный университет

Электронная почта: yura15cbx@gmail.com

Проведен сравнительный анализ морфологии распластанных *in vitro* гемоцитов двух видов двустворчатых моллюсков: Приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* и Тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus*. Межвидовое сравнение одиночных распластных гемоцитов и клеточных сообществ из двух и трех соприкасающихся клеток выявили достоверные различия по ряду линейных и нелинейных параметров, что показывает принципиальную возможность численного описания сложных, «неправильных» с точки зрения классической геометрии форм распластных *in vitro* клеток, а также таксоноспецифичность их морфологии.

Для гемоцитов мидии более высокими по сравнению с гемоцитами гребешка оказались значения следующих параметров: площадь клетки; максимальная протяженность выпуклой оболочки клетки; площадь выпуклой оболочки; максимальный радиус, опущенный из центра масс выпуклой оболочки на границу выпуклой оболочки; диаметр ограничивающей клетку окружности; средний радиус из центра ограничивающей окружности на выпуклую оболочку. По значениям линейных параметров, использованных для морфометрии одиночных клеток, у гемоцитов мидии оказались выше следующие: соотношение площадей частей клетки, попадающих в различные половины ограничивающей клетку окружности (параметр показывающий степень асимметрии клетки внутри ограничивающей окружности); соотношение площади клетки к площади вписанного круга. Значения нелинейных параметров гемоцитов мидии выше сравнительно с таковыми гемоцитов гребешка по таким признакам как: три типа лакунарностей и средняя массовая размерность (Mean Mass Fractal Dimension, Mean Dm). Значения параметров: размерность группированного распределения вероятностей (Binned Probability Distributions Fractal Dimension, BPDFD); средняя размерность, полученная путем подсчета квадратов (Mean D); средняя локальная размерность связных множеств (Mean Local Connected Fractal Dimension, LCFD); средняя локальная фрактальная размерность (Mean Local Fractal Dimension, LFD) выше для гемоцитов гребешка по сравнению с гемоцитами мидии, однако параметры LCFD и LFD имеют у мидии столь широкие доверительные интервалы, что различие между видами лежит на грани достоверности.

Кроме силуэтных черно-белых изображений, анализировались контурные изображения клеток, представленные однопиксельной обрисовкой границ клетки. Контурные отображения гемоцитов гребешка характеризуются лишь более высоким значением LCFD, значения параметров BPDFD, протяженность клеточных границ, Mean Dm, два типа лакунарностей, Mean D контурных изображений гемоцитов были более высокими у мидии.

Полученные результаты показывают достоверное отличие гемоцитов мидии от гемоцитов гребешка в культуре по ряду линейных и нелинейных параметров. Такие отличия говорят о генетически заданных отличиях линейных размеров и паттерна двумерных отображений гемоцитов двух рассмотренных видов двустворчатых моллюсков, которые могут зависеть от видовых особенностей организации цитоскелета, концентрации и распределения молекул клеточной адгезии, особенностей клеточного поведения и других факторов, влияющих на форму распластанной клетки. Исследование биологических отличий гемоцитов разных видов беспозвоночных, как в норме, так и при экспериментальных воздействиях, сопоставленное с численными данными морфометрии сложных клеточных форм, позволит расшифровать «язык» значений морфометрических параметров, наполнить их биологическим смыслом, с одной стороны, и, с другой, численно, с помощью анализа клеточной формы, описать особенности клеточного поведения, клеточных реакций на окружение, некоторые особенности организации клеток на субклеточном уровне.

Влияние эпимутагена Тритона X-100 на морфо-физиологические признаки у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

С.С. Кирикович, Е.В. Левитес
Институт цитологии и генетики СО РАН
Электронная почта: svetak@bionet.nsc.ru

Для развития генетических и эпигенетических исследований необходим поиск веществ, вызывающих изменчивость. Существующие представления о структурно-функциональной организации генома позволяют предположить, что источником изменчивости могут быть вещества, влияющие на взаимодействие хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом. В связи с этим исследовано влияние неионного детергента Тритон X-100 на изменчивость у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Показано, что воздействие Тритоном X-100 вызывает снижение энергии прорастания семян, выражающееся в продлении сроков прорастания.

В контрольных и обработанных Тритоном X-100 растениях сахарной свеклы выявлен полиморфизм по ряду морфологических признаков листа и корня. В качестве наиболее четко идентифицируемых признаков были выбраны следующие: *загиб листа*, *загиб корня*, *глазки* на головке корня, *облиственность головки корня*, *короткий корень* и *мелкий корень*. Степень проявления признаков изменялась во времени как в опытной, так и в контрольной группах растений. Поэтому учет признаков проводили в два срока. Наиболее сильные различия между контролем и опытом наблюдались в момент осенней оценки. Исключение составляет признак *загиб листа*, различия по которому между контролем и опытом выявились уже в момент высадки растений в грунт. Обращает на себя внимание также тот факт, что возникающие под действием Тритона X-100 изменения очень разнообразны. Так, например, если *загиб листа* и *загиб корня* можно рассматривать как результат разной скорости деления клеток на разных сторонах данного органа, то увеличенный процент *глазков* на корнях, обработанных Тритоном X-100 растений, говорит о том, что здесь затронуты процессы дифференцировки и качественной перестройки работы генома.

Показано, что Тритон X-100 изменяет динамику проявления признака фертильности-стерильности пыльцы у однолетней сахарной свеклы. Достоверность различий свидетельствует о том, что Тритон X-100 эффективно изменяет физиологические процессы у исследуемых растений.

Большое число разнообразных изменений говорит о том, что воздействию Тритона X-100 подвергается не отдельный ген, а значительная часть генома. Поскольку эти изменения наблюдаются на стадиях развития, отделенных от момента воздействия Тритоном X-100 большим промежутком времени и большим числом клеточных поколений, можно предположить, что на мембранах имеются участки, несущие информацию о взаимодействии с хромосомами, и эти участки способны не только изменяться под действием Тритона X-100, но и сохранять измененное состояние в ряду клеточных поколений.

В основе таких изменений может лежать способность Тритона X-100 не только изменять структуру мембран и отделять от мембран белки, но и изменять взаимодействие нуклеопротеидов с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Такое воздействие Тритона X-100 хорошо согласуется с моделью многомерного кодирования наследственной информации у растений (Levites, 2003, 2005, 2007) и свидетельствует о роли взаимодействия хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом в функционировании генома и в его изменчивости.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг. «Индукция эпигенетических изменений как новый эффективный метод создания исходных селекционных форм растений».

1. Levites E.V. Theoretical and practical aspects of studies in epigenetic variability in sugarbeet // Sugar Tech. 2003. V.5. № 4. P. 209–211.
2. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. 2005. V.7. № 2/3. P. 67–70.
3. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants. 2007. <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>

Стабильность наследования и экспрессия генов *rolC* и *nptII* в 15-летних клеточных культурах женьшеня *Panax ginseng*

К.В. Киселев

Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: kiselev@biosoil.ru

Показано, что через 15 лет после получения трансгенных клеточных культур *Panax ginseng*, гены *rolC* и *nptII* активно экспрессируются в трансформированных клетках (Kiselev et al., 2009). Далее анализировали нуклеотидную последовательность генов *rolC* и *nptII*, полученную из ДНК культур клеток женьшеня. Установлено, что последовательность генов *rolC* и *nptII* в каллусах подвергалась мутагенезу, в частности, обнаружены замены нуклеотидов, от 1 до 4 на последовательность всего гена (540 п.н. для *rolC* и 798 п.н. для *nptII*). Примерно в половине случаев замены нуклеотидов изменяли структуру кодируемого геном продукта. Благодаря тому, что анализировали последовательность генов *rolC* и *nptII* из ДНК клеточных культур, выращенных в 1995 и 2007 годах, мы смогли показать, что за 13 лет культивирования происходит достоверное увеличение на 13% уровня нуклеотидных замен в последовательностях анализируемых генов, с 1.21 ± 0.02 до 1.37 ± 0.07 нуклеотидов на 1000 проанализированных нуклеотидов. При этом уровень нуклеотидных замен в генах *rolC* и *nptII*, полученных с плазмидной ДНК был достоверно ниже в 15-20 раз. Анализируя направления нуклеотидных замен обнаружено, что замена на Г или Ц нуклеотиды была значительно больше, чем все другие возможные варианты (табл.1). Таким образом, впервые показан уровень и скорость накопления нуклеотидных замен в последовательности перенесенных генов в геноме клеток растений в условии *in vitro* при длительном культивировании.

Таблица 1 Частота встречаемости нуклеотидных замен в вариантах генов *rolC* и *nptII* из клеточных культур женьшеня. Результаты представлены как % частоты встречаемости нуклеотидных замен, в скобках общее количество нуклеотидных замен.

нуклеотидные замены	<i>nptII</i> (СИ, 1995)	<i>nptII</i> (СИ, 2007)	<i>nptII</i> (2cR2, 1995)	<i>nptII</i> (2cR2, 2007)	<i>rolC</i> (СИ, 1995)	<i>rolC</i> (СИ, 2007)	<i>rolC</i> (2cR2, 1995)	<i>rolC</i> (2cR2, 2007)
A→T	0	0	0	0	1.4 ±1.4 (1)	0	0	0
A→G	17.7 ±2.0 (20)	12.0 ±5.9 (13)	14.4 ±1.6 (13)	5.8 ±0.6 (6)	21.1 ±4.5 (13)	28.1 ±3.1 (24)	23.6 ±2.9 (14)	28.5 ±1.8 (14)
A→C	0	0	0	0	0	1.4 ±1.4 (1)	0	0
T→A	0	3.9 ±0.3 (4)	0	0	0	0	0	0
T→G	3.5 ±3.5 (5)	4.9 ±1.3 (5)	3.6 ±1.0 (3)	1.2 ±1.2 (1)	5.4 ±0.3 (3)	2.8 ±2.8 (2)	6.3 ±6.3 (3)	0
T→C	55.9 ±11.6 (62)	50.3 ±10.9 (52)	43.4 ±0.2 (36)	54.2 ±4.2 (49)	45.1 ±6.2 (27)	36.5 ±3.2 (31)	31.6 ±6.6 (19)	43.1 ±3.6 (20)
G→T	3.9 ±2.5 (4)	1.8 ±1.8 (2)	4.7 ±2.1 (4)	0	5.4 ±0.3 (3)	0	7.7 ±4.8 (4)	0
G→A	5.7 ±1.4 (7)	7.9 ±4.4 (8)	7.2 ±0.5 (6)	10.8 ±1.7 (10)	5.4 ±0.3 (3)	13.6 ±5.3 (12)	10.9 ±6.7 (7)	9.4 ±2.8 (5)
G→C	5.0 ±5.0 (7)	8.9 ±8.9 (10)	3.8 ±3.8 (3)	5.2 ±5.2 (5)	8.3 ±8.3 (3)	1.1 ±1.1 (1)	6.3 ±6.3 (3)	8.1 ±5.2 (3)
C→T	8.3 ±6.0 (11)	10.5 ±0.3 (11)	22.9 ±0.2 (19)	22.9 ±2.1 (21)	8.1 ±3.0 (4)	12.5 ±4.2 (10)	13.6 ±1.1 (8)	9.4 ±2.8 (5)
C→G	0	0	0	0	0	4.1 ±4.1 (3)	0	1.5 ±1.5 (1)
C→A	0	0	0	0	0	0	0	0

1. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 1273-1278

Медикаментозное лечение опухолей гипофиза

Д.Ю. Конькова

Амурская государственная медицинская академия

Электронная почта: dashunichka2009@rambler.ru

В настоящее время значительно расширился арсенал средств, применяемых для медикаментозной терапии опухолей гипофиза в связи с их распространенностью и гетерогенностью в отношении гормональной активности. Медикаментозная терапия является первичным методом лечения пролактином, как микро-, так и макропролактином, в том числе с симптомами объемного образования хиазмально-селлярной области и наличием кистозного компонента. Для лечения пролактином используются две группы препаратов, являющиеся агонистами дофамина: производные алкалоидов спорыньи (эрголиновые) и препараты, не относящиеся к алкалоидам спорыньи (неэрголиновые). Первые включают в себя препараты короткого действия бромокриптин и абергин и эрголиновое производное с длительным и селективным действием каберголин. Ко вторым относится синтетический препарат хинаголид. По данным большинства зарубежных и отечественных авторов эффективность медикаментозной терапии пролактином составляет около 80%. Лечение агонистами дофамина приводит к снижению уровня пролактина, улучшению зрения, нормализации половой функции, регрессу цефалгического синдрома и уменьшению размеров опухоли. В большинстве случаев в алгоритме лечения СТГ-продуцирующих аденом хирургический метод занимает ведущее положение, при неэффективности которого в дальнейшем назначается медикаментозная терапия. В лечение больных акромегалией используются две группы препаратов: аналоги соматостатина и агонисты дофамина. Среди аналогов соматостатина выделяют две группы препаратов: 1) короткого действия- сандостатин (октреотид), 2) длительного действия- соматулин (ланреотид) и сандостатин-ЛАР. Адекватного контроля акромегалии не достигается у 40% больных, получающих медикаментозную терапию аналогами соматостатина. Полученные данные литературы показывают, что агонисты дофамина не могут рассматриваться в качестве приемлемого первичного лечения для большинства больных, поскольку циркулирующие уровни СТГ и ИРФ-1 нормализуются у небольшого количества пациентов. В настоящее время не существует действенной медикаментозной терапии АКТГ-секретирующих опухолей. Фармакотерапия при болезни Иценко-Кушинга применяется в основном в качестве дополнительного лечения в виде препаратов, блокирующих биосинтез стероидов в надпочечниках. К ним относятся производные кетоконазола, аминоглутетимида и параклорфенила. При сопоставлении данных различных исследований можно сделать вывод о том, что для более эффективной медикаментозной терапии неактивных опухолей гипофиза, большинство из которых имеют гонадотрофное происхождение, необходимо назначение препаратов агонистов дофамина, соматостатина и антагонистов гонадолиберина в более высоких терапевтических дозах минимум как на 6-12 мес и ожидание положительного результата не более чем у 30% больных. В нескольких исследованиях было показано, что аналоги соматостатина могут подавлять секрецию ТТГ более чем у 90% больных с тиреотропиномами с нормализацией тиреоидных гормонов у 75% из них. Первичная терапия аналогами соматостатина может быть приемлемой в период предоперационной подготовки больных с микротиреотропиномой, а также макротиреотропиномой или инвазивными опухолями, имеющими высокий риск отсутствия эффективности после операции с целью уменьшения объема опухоли и последующего ее радикального удаления.

Таким образом, медикаментозная терапия является методом выбора в лечении пролактином. В лечение СТГ-продуцирующих, ТТГ-продуцирующих, неактивных опухолей гипофиза ведущее место занимает хирургический метод, а в отношении АКТГ-продуцирующих опухолей вообще не существует действенной медикаментозной терапии.

Морфометрический анализ структурных параметров стабильных гибридов, полученных слиянием эмбриональных стволовых и дифференцированных клеток

Е.Ю. Короткевич

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН

²Новосибирский государственный университет

Электронная почта: savgard@gorodok.net

В последнее время большое внимание уделяется изучению механизмов репрограммирования генома соматических клеток. К важным, но недостаточно исследованным вопросам относится анализ изменений сопровождающих этот процесс на уровне ультраструктуры клеток. Одним из оригинальных подходов к изучению репрограммирования генома является анализ молекулярно-биологических и морфологических характеристик гибридных клеток, полученных при слиянии соматических клеток с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). Для получения полной картины происходящих в клетках изменений часто требуется проведение не только качественной, но и количественной оценки структурных параметров клеток.

Целью данной работы было изучение ультраструктурной организации клеток стабильных гибридов, полученных слиянием ЭСК и фибробластов мышцы различной ploидности, проведение сравнительного анализа морфологии перечисленных клеток, а также оценка с помощью методов морфометрического анализа ядерно-цитоплазматических соотношений клеток и относительной площади поверхности ядерной оболочки. Установлено, что ЭСК имеют округлую форму, слабо развитый синтетический аппарат и обедненную внутриклеточными компонентами цитоплазму. В отличие от недифференцированных клеток, фибробласты характеризуются вытянутой формой, расширенными цистернами эндоплазматического ретикулума и высокой плотностью органелл в цитоплазме. Проведенные исследования показали, что гибридные клетки, полученные при слиянии диплоидных фибробластов мышцы с эмбриональными стволовыми клетками, сходны с ЭСК по основным морфологическим параметрам. В противоположность этому, клетки гибридов, полученных в результате слияния тетраплоидных фибробластов с ЭСК, имеют морфологию сходную со строением исходных фибробластов. Однако оба типа гибридов отличаются значительными инвагинациями ядерной оболочки. Морфометрический анализ выявил существенные отличия между гибридами первого и второго типа по таким параметрам как ядерно-цитоплазматические отношения (0,59 и 0,28, соответственно), относительная площадь поверхности ядра ($0,94 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$ и $0,48 \text{ мкм}^2/\text{мкм}^3$, соответственно) и мембран эндоплазматического ретикулума. Предполагается, что зарегистрированные на качественном и количественном уровне различия в организации гибридных клеток, полученных в результате слияния ЭСК с ди- и тетраплоидными дифференцированными клетками, обусловлены присутствием разного количества хромосом в гибридном ядре, а также экспрессией специфических генов.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ и МКБ РАН
Научный руководитель: - к.б.н., в.н.с. Киселева Е.В.

Определение гомологии ингибиторов протеаз методами биоинформатики

А.В. Коротких, И.Э. Памирский
Амурская Государственная Медицинская Академия
Электронная почта: ssemioo@rambler.ru

Протеолиз – гидролиз пептидных связей белков, катализируемый протеазами. В условиях патологии протеазно-ингибиторный баланс нарушается. Поэтому проблема медикаментозного регулирования процессов протеолиза является актуальной для современной медицины. На сегодня, по сути, единственным лекарственным препаратом для подавления активности протеаз является апротинин – животный полипептид, выделяемый из легких и поджелудочной железы крупного рогатого скота, выпускаемый рядом фирм под различными коммерческими названиями «Контрикал», «Трасилол», «Гордокс». Однако, апротинин имеет целый ряд недостатков. Это вызывает интерес к поиску аналогов апротинина, лишенных подобных недостатков. Одним из подходов к решению этой задачи является использование биоинформатики, решающей задачи классической биохимии и молекулярной биологии. В Интернете нами было найдено и просмотрено около 50 электронных баз данных белков, среди которых информацию об апротинине и СИТ содержат только 9 баз. В данных базах встречается следующая информация: идентификационный номер белка, описание молекул, их предшественников, первичной последовательности, структурных уровней, реакционного центра, молекул-мишеней, механизма действия, биологической активности, белков-гомологов; классификация белков, таксономические сведения (кланы, подкланы, семейства, подсемейства). В ходе поиска различных компьютерных программ и Интернет-серверов для решения поставленной задачи выбор был оставлен на программе Bio Edit 5.0.9 и сервере BLAST. Сервер BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) является интернет-аналогом Bio Edit. Принцип их работы заключается в выравнивании последовательностей белков и сравнении эквивалентных аминокислотных остатков (Florencio Pazos et al, 2006). Результаты со сходством свыше 30%, эквивалентны по точности рентген исследованию (Zhexin X. et al, 2006). В программу и сервер вводили аминокислотные последовательности ингибиторов в формате FASTA, где каждый аминокислотный остаток обозначается одной заглавной английской буквой. BLAST показал, что ингибиторы не схожи, а Bio Edit, что они идентичны на 3% и подобны на 12%. Низкий процент сходства можно объяснить, главным образом, отличием длины полипептидных цепей исследуемых ингибиторов (апротинин содержит 58 остатков, соевый ингибитор трипсина - 181 остаток). В сумме гомология обнаружена по 16 парам аминокислотных остатков. Сравнение отдельных аминокислотных областей молекул апротинина с СИТ показывает более высокий уровень гомологии. Гомология N-концевой области СИТ (участок цепи 5-60) и апротинина без 2-х крайних N-концевых аминокислот составила 21%. Центральная область СИТ (участок цепи 85-116) и участок цепи апротинина 25-56 схожи 24%. Наиболее гомологичными (35%, сходство обнаружено по 16 парам аминокислотных остатков) оказались С-концевая область СИТ (участок цепи 132-181) и цепи апротинина без 6 последних С-концевых аминокислотных остатков. В целом, полученные данные биоинформатики показали однотипность строения функциональных участков апротинина и СИТ, что явилось предпосылкой дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

Сезонная динамика содержания пигментов и полисахаридов красной водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Harv.) Masuda. (Rhodophyta, Phyllophoraceae)

А.О. Кравченко, И.М. Яковлева, А.О. Барабанова

¹Институт химии и прикладной экологии, Дальневосточный государственный университет

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН

³Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: anuta@piboc.dvo.ru

Красные водоросли являются источником широкого ряда биологически активных веществ. В состав клеточной стенки макрофитов входит набор водорастворимых полипептидов и пигментов: фикобилипротеинов (фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин), карратиноидов α , β и хлорофиллов а и b. Фикобилипротеины обладают яркой окраской и очень интенсивной флуоресценцией, поэтому находят применение в иммунофлуоресцентной диагностике и других биологических исследованиях. Они весьма перспективны в косметической и пищевой промышленности, где преимущество использования натуральных красителей перед синтетическими достаточно очевидно. Рассматривается возможность применения фикобилипротеинов как противоопухолевых препаратов.

Основными структурными компонентами клеточной стенки красных водорослей являются сульфатированные полисахариды - каррагинан и агар, обладающие уникальной способностью образовывать вязкие растворы и прочные гели, что в целом определяет их широкое практическое использование.

Нами изучены сезонные изменения в содержании полисахаридов и пигментов – фикобилипротеинов, карратиноидов и хлорофиллов в распространенной на Дальнем Востоке морской красной водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Phyllophoraceae). Водоросли, представленные репродуктивной формой (карпоспорофиты), были собраны с февраля по июнь 2009 г в Амурском заливе, мыс Красный, Японское море.

Идентификацию фикобилипротеинов проводили по форме спектральных кривых полученных экстрактов водорослей и положению максимумов поглощения в области 565 нм, которая, согласно известной классификации Хирозе, соответствует R-фикоэритрину (R-PE), а также в областях 650 и 615-620 нм, характерных для фикоцианина (R-PC) и R-аллофикоцианина (R-APC) соответственно.

Согласно результатам анализа и расчетным данным, количество фикоэритрина (R-PE), в экстрактах является преобладающим, независимо от времени сбора водоросли, тогда как соотношение R-PC и R-APC меняется каждый месяц. Наибольшее содержание R-PE и R-PC наблюдается в июне, а R-APC – в мае. С февраля до начала апреля, происходит увеличение содержания R-PE и R-PC, в то время как количество R-APC постепенно снижается. В конце апреля содержание всех фикобилипротеинов в талломах водоросли резко падает. В мае и июне наблюдается увеличение содержания R-PE и R-PC и уменьшение R-APC.

Идентификацию хлорофилла-а и карратиноидов в экстрактах проводили по максимумам поглощения на спектральных кривых при 664 и 480 нм соответственно. Как показали результаты, содержание хлорофилла-а и карратиноидов с февраля до начала апреля увеличивается, тогда как в конце месяца наблюдается резкое снижение их количества, а с мая происходит уменьшение содержания хлорофилла-а и накопление карратиноидов. Можно предположить, что снижение содержания всех исследованных фотосинтетических пигментов в апреле связано с резким повышением уровня солнечной радиации, в особенности ультрафиолетовой части спектра, в этот период.

Согласно предварительным результатам полисахариды, выделенные из *Ah. flabelliformis*, представляют собой смесь каррагинана и агара. Наибольшее содержание полисахаридов в талломах исследованной водоросли наблюдается в зимнее время (февраль).

Противовоспалительная активность нового синтетического соединения β -циклодекстрина и ацетилсалициловой кислоты

А.В.Кулешов, Т.А. Баталова
Амурская государственная медицинская академия
Электронная почта: akul-79@mail

В нашем исследовании использовалось производное ацетилсалициловой кислоты и β -циклодекстрина (АКЦД). β -Циклодекстрин – циклический олигосахарид, состоящий из 7 остатков глюкозы, имеющий 21 реакционноспособную гидроксильную группу. Сегодня циклодекстрины привлекли внимание специалистов различных областей и применяются для улучшения растворимости в воде, предотвращения слёживаемости, стабилизации веществ, конструирования наночастиц. АКЦД представляет собой смесь производных сложных эфиров ацетилсалициловой кислоты и β -циклодекстрина со средней степенью замещения 3,5.

Проводились эксперименты *in vivo* по изучению влияния АКЦД. Исследования проводились на белых беспородных лабораторных крысах-самцах. Животные были разбиты на три группы: 1 – интактная (10), получавшие инъекции физраствора; 2 – контрольная группа (10), получавшая АК; 3 - экспериментальная группа (10), получавшая АКЦД. Препараты вводились внутривенно. Концентрация АК соответствовала терапевтической дозе. Доза АКЦД, в концентрации в пересчете на эквивалент АК, соответствовала $\frac{1}{2}$ дозе АК (группа сравнения). Двойное уменьшение дозы было выбрано для предотвращения резкого снижения свертываемости крови, принимая во внимание результаты параллельно проводимых исследований по антиагрегационной активности АКЦД *in vitro*. Противовоспалительный эффект оценивался по уменьшению объема лапы при отеке, вызванном асептическим воспалением, лабораторными показателями числа лейкоцитов, общего белка. Эксперимент продолжался в течение семи дней.

Результаты показали, что несмотря на то, что экспериментальная доза химического соединения из β -циклодекстрина и аспирина была в 2 раза ниже дозы аспирина в контрольной группе, антиагрегационный и противовоспалительный эффекты были выражены у подопытных животных в более значительной мере. Данное явление можно связать с тем, что β -циклодекстрин и его многочисленные производные являются своеобразными «контейнерами» лекарственных препаратов. Имеются достоверные сведения о том, что в изучаемом нами химическом соединении, в биосреде, происходит отщепление АК от ЦД. предполагается, что интенсивность этого отщепления наиболее высока в месте воспаления. Благодаря этому, в патологическом очаге воспаления количество противовоспалительного препарата, доставленного циклодекстрином, становится больше, чем в группе с обычной формой препарата, что и предопределяет более низкую дозу АКЦД, необходимую для достижения терапевтического действия.

Изучение флавиновых радикалов в анионной форме в Na^+ -транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазе методами импульсного ЭПР

Л.В. Кулик¹, А.А. Пивцов¹, А.В. Богачев²

¹Институт Химической Кинетики и Горения Сибирского Отделения РАН

²НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

Электронная почта: chemphy@kinetics.nsc.ru

Na^+ -транслоцирующая NADH:хинон оксидоредуктаза (Na^+ -NQR) – один из ферментов дыхательной цепи бактерий. Он встроен в липидную мембрану и работает как натриевый насос, создающий трансмембранный Na^+ электрохимический потенциал [1]. Na^+ -NQR состоит из шести белковых субъединиц и содержит четыре различные флавиновые простетические группы, в том числе два флавиномононуклеотида (FMN), ковалентно связанных с субъединицами NqrB и NqrC. Предполагается, что молекулы FMN принимают участие в процессе переноса электрона, сопряженном с переносом Na^+ через мембрану. При этом совершаются несколько различных окислительно-восстановительных переходов в молекулах FMN [2].

В данной работе ферменты Na^+ -NQR из бактерии *Vibrio Harveyi* были уравновешены в двух различных окислительно-восстановительных потенциалах для приготовления двух образцов. Один из них содержал оба флавиномононуклеотида (FMN_{NqrB} и FMN_{NqrC}), другой – только один (FMN_{NqrB}) в парамагнитном состоянии. Было проведено сравнительное изучение этих образцов методами импульсного ЭПР (электронный парамагнитный резонанс), ДЭЯР (двойной электрон-ядерный резонанс) и ДЭЭР (двойной электрон-электронный резонанс). Спектры ЭПР и времена спиновой релаксации оказались очень близки для этих двух образцов. Также оказались весьма похожи их спектры ДЭЯР. Величина расщепления внешних пиков в спектрах ДЭЯР, обусловленных C(8) метильными протонами, характерна для анионной формы флавиновых радикалов. Методом ДЭЭР было определено расстояние между центрами тяжести спиновой плотности радикалов FMN_{NqrB} и FMN_{NqrC} – 2.07 нм. Оценка расстояния r_e между краями изоаллоксазиновых колец молекул FMN_{NqrB} и FMN_{NqrC} дает $1.17 \text{ нм} < r_e < 2.07 \text{ нм}$. На основании того, что нижняя граница этой оценки соответствует достаточно малому расстоянию между молекулами FMN_{NqrB} и FMN_{NqrC} , предположено, что между ними происходит прямой перенос электрона в ходе физиологического цикла Na^+ -NQR.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-03-00261-а.

1. Zhou W., Bertsova Y.V., Feng B., Tsatsos P., Verkhovskaya M.L., Gennis R.B., Bogachev A.V., Barquera B.// Biochemistry 1999. V. 38, pp. 16246-16252.
2. Bogachev A.V., Kulik L.V., D. A. Bloch, Bertsova Y.V., Fadeeva M.S., Verkhovsky M.I.// Biochemistry 2009, ASAP, DOI: 10.1021/bi900524m.

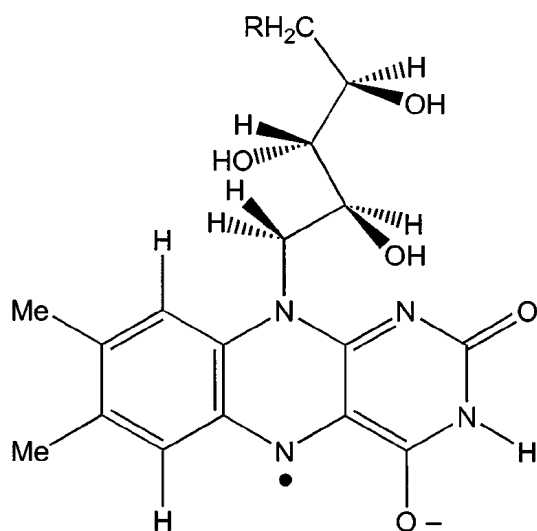


Рис. 1. Химическая структура радикала FMN в анионной форме.

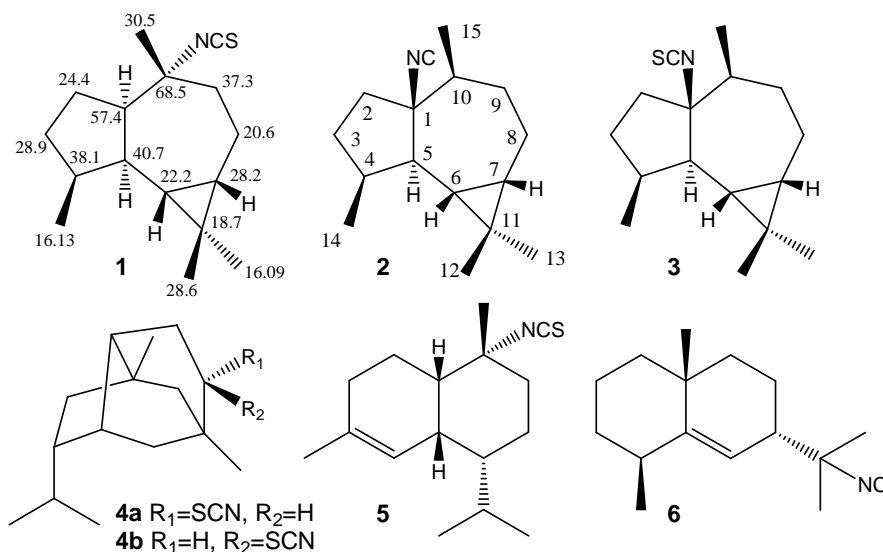
Вторичные метаболиты вьетнамского голожаберного моллюска *Phyllidiella pustulosa*

Е.Г. Ляхова¹, С.А. Колесникова¹, А.И. Калиновский¹, В.А. Стоник¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: elyakhova@inbox.ru

Голожаберные моллюски семейства Phyllidiidae широко известны как источник разнообразных токсичных сесквитерпеноидов, содержащих цианатные, изоцианатные, тиоцианатные и изотиоцианатные группы. Эти моллюски питаются губками и вещества, попадающие в их организм с пищей, затем используются мягкотелыми беспозвоночными для химической защиты против хищников. Некоторые из полученных веществ обладают различными видами биологической активности, среди которых противомикробная, противообратательная, противогрибковая, инсектицидная и противомаларийная. Известно, что качественное и количественное содержание вторичных метаболитов в экстрактах голожаберных моллюсков зависит от времени, места обитания и источника питания этих животных. [1]

Из экстракта моллюсков *Phyllidiella pustulosa*, собранных в рейсе ОЗ4 на НИС «Академик Опарин» у побережья Вьетнама, сочетанием хроматографических методов были выделены 7 сесквитерпеноидов, включая новый изотиоцианат **1** и ряд ранее известных метаболитов **2**, **3** [2], **4a**, **4b** [3], **5** [4] и **6** [5].



Структуры и стереохимия нового соединения **1** были определены методами ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и сравнением полученных данных с литературными. ЯМР спектры **1** были идентичны со спектрами ранее известного синтетического (-)-аллоаромадендрана [6]. Однако, соединение **1** показало оптическое вращение $[\alpha]_D^{20} +6,0^\circ$ (с 0,15; CHCl₃) близкое по значению, но противоположное по знаку оптическому вращению (-)-аллоаромадендрана $[\alpha]_D^{20} -5,9^\circ$ (с 2,10; CHCl₃). Следовательно, новое соединение **1** имеет 1R,4S,5S,6R,7S,10R абсолютную конфигурацию и является энантиомером ранее известного продукта. Состав низкомолекулярных метаболитов голожаберных моллюсков семейства Phyllidiidae, обитающих у берегов Вьетнама исследован впервые.

- Blunt J. W., Copp B. R., Hu W.-P., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R. // Nat. Prod. Rep. 2009. V. 26. P. 170-244, и предыдущие обзоры этой серии.
- Mayol L, Piccilli V., D. Sica // Tetrahedron. 1987. V. 43, N 22. P. 5381-5388.
- Yasman; Edrada R.A.; Wray V.; Proksch P. J. // Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1512-1514.
- Burreson B. J., Christophersen C., Scheuer P. J. // Tetrahedron. 1975. V. 31, N 13. P. 2015-2018.
- Ciminello P., Fattorusso E., Magno S., Mayol L. // Can. J. chem. 1987. V. 65. P. 518-522.
- Silva C. C., Almagro V., Zukerman-Schpector J, Castellano E. E., Marsaioli A. J. // J. Org. Chem., 1994. V. 59, N 10. P. 2880-2881

Разработка липид-сапонинового носителя субъединичных антигенов

А.Н. Мазейка¹, Э.Я. Костецкий¹, П.В. Веланский¹, Н.С. Воробьева¹, О.Ю. Портнягина²

¹ Дальневосточный государственный университет

² Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: NikAndrei@inbox.ru

Применение в составе вакцин наночастиц, несущих на своей поверхности субъединичные антигены, позволяет многократно усиливать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, получаемый при вакцинации. Реализация такого подхода в создании новых вакцин требует разработки эффективной технологии получения соответствующих носителей и введения в них субъединичных антигенов при сохранении нативной структуры и ориентации в пространстве вводимых макромолекул. К носителям антигенов такого рода предъявляются жесткие требования: полная биологическая деградируемость, отсутствие токсичности, наличие адьювантной активности, способность активно включать в свою структуру антигены. Нами предложен новый подход к разработке носителей субъединичных антигенов, основанный на способности природных компонентов биологических мембран к самосборке, сопровождающейся формированием вирусоподобных частиц, что позволяет одновременно удовлетворить жестким требованиям технологии и биологической эффективности.

В качестве компонентов носителя мы использовали моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ) и холестерол (Хол), являющиеся одними из основных компонентов биологических мембран. Также в состав носителя входил кукмариозид А₂-2 (КДА) – тритерпеновый гликозид, обладающий выраженной иммуностимулирующей активностью в сверхнизких дозах. КДА был выделен из *Cuscutaria japonica* путем последовательной хроматографии на полихrome-1, силикагеле, ВЭЖХ-МС на обращенной фазе С-18 и силикагеле, чистоту препарата контролировали С¹³-ЯМР. МГДГ из *Zostera marina* и *Sargassum pallidum* выделяли путем колоночной хроматографии на силикагеле, очищали путем препаративной ТСХ на силикагеле. Суспензию носителя получали диспергируя холестерин-гликолипидную пленку в растворе КДА в фосфатно-солевом буфере с помощью ультразвука.

Исследования полученных липид-сапониновых суспензий с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастированием и ПЭМ с энергетической фильтрацией показали, что наночастицы носителя могут образовываться в широком интервале соотношения компонентов комплекса (Хол:КДА 1-2:3 и МГДГ:КДА 2-8:3 по массе). Однако для получения носителя оптимальным являлось эквимолярное соотношение его компонентов (МГДГ:Хол:КДА 2:1:3). Увеличение содержания холестерина вдвое приводило к появлению большого количества «несвязанного липида», тогда как увеличение доли МГДГ 2,5 раза приводило к появлению лишь небольшого его избытка.

Установлено, что гемолитическая активность КДА в составе полученного носителя при эквимолярном соотношении его компонентов падала в 30-18 раз. Гемолитическая активность носителя при изменении отношения Хол:КДА от 2:3 до 1:3 не менялась, однако носители полученные на основе МГДГ из *Z. marina* оказались более гемолитичными, чем содержащие МГДГ из *S. pallidum*. При повышении содержания МГДГ в носителях от МГДГ:КДА 2:3 до 7,5:3 гемолитическая активность носителей имела тенденцию возрастать, что, вероятно, связано с наличием собственной гемолитической активности у МГДГ.

При внутрикожном введении мышам разрабатываемого носителя антигенов (МГДГ:Хол:КДА 2:1:3) в комплексе с тримером порина из *Yersinia pseudotuberculosis* было показано, концентрация антител в сыворотки крови животных в 4 раза превышала таковую величину, полученную при введении чистого белка.

Противомикробная активность экстрактов из бурых водорослей

Е.А. Мартыяс, М.М. Анисимов, Н.И. Герасименко

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: martyyas@mail.ru

Увеличение числа устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов и снижение эффективности лечения больных антибиотиками требует целенаправленного поиска новых активных химиопрепаратов. Экстрактивные вещества морских водорослей Мирового океана дают положительные эффекты против устойчивых к антибиотикам патогенным микроорганизмам [1–3]. Дальневосточные моря предоставляют исследователям большое разнообразие морских водорослей, экстрактивные вещества из которых могут представлять интерес как противомикробные вещества, которые могут найти применение в медицине и сельском хозяйстве.

Были получены полные экстракты из морских водорослей: *Fucus evanescens* – 1–6, 10; *Laminaria yezoensis* – 7; *Sargassum miyabei* – 8; *L. bongardiana* – 9; *Alaria fistulosa* – 11; *L. bongardiana f. bongardiana* – 12, 13; *Analipus japonicus* – 14; *Cocophora langsdorfii* – 15; *L. longipes* – 16; *L. yezoensis* – 17. Экстракты получали при помощи бинарных смесей растворителей ацетон :этанол (2:1) и хлороформ :этанол (2:1).

Противомикробная активность. Микроорганизмы *Safale S-04*, *Candida albicans* КММ 455, *Fusarium oxysporum* КММ 4639, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Escherichia coli* ATCC 15034 были предоставлены нам из Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ, Россия). Противомикробную активность определяли методом диффузии в агар-агар. О противомикробной активности судили по ширине зоны ингибирования роста микроорганизмов (в мм от края лунки). ДМСО (18) использовали как отрицательный контроль. В качестве положительного контроля использовали препарат широкого спектра действия нитрофунгин (0.1 мг/мл) (19).

Результаты. Результаты исследований показали, что экстракты из различных морских водорослей по-разному действуют на исследуемые микроорганизмы. Наиболее чувствительными оказались грамположительные бактерии *St. aureus*, эти данные согласуются с литературными, так как в большинстве работ сообщалось, что экстрактивные вещества морских водорослей в основном ингибируют рост грамположительных бактерий [1]. Менее чувствительными – *E. coli*, *Safale S-04*, *C. albicans* и *F. oxysporum*. Наиболее сильным антистафилококковым эффектом обладали экстракты 11 и 17. Экстракты 1, 7 и 14 в испытуемых концентрациях ингибирующего эффекта не показали (рис. 1).

Результаты наших исследований сопоставимы с данными представленными в литературе, согласно которым противомикробная активность экстрактов из морских водорослей значительно колебалась в зависимости от сезона года и места сбора сырья [2-3].

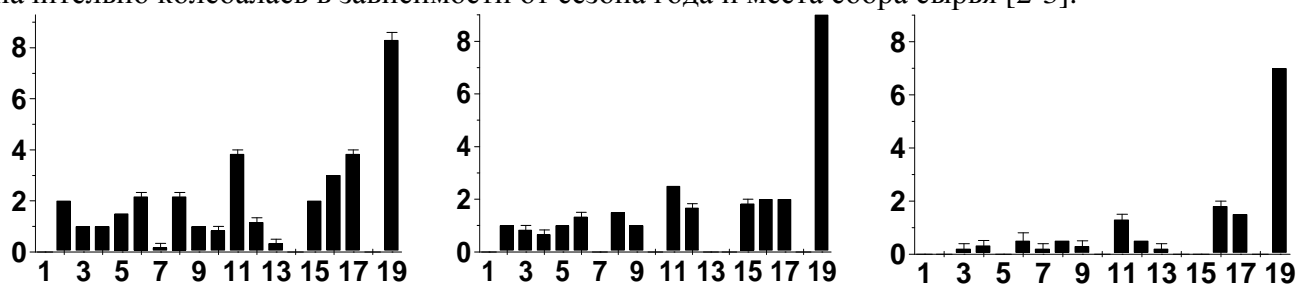


Рис.1 Зоны ингибирования микроорганизмов, экстрактами морских водорослей, ось x – номера экстрактов, ось y – зона ингибирования, мм от края лунки.

1. Ibtissam C., Hassane R., José M.L., Francisco D.S.J., Antonio G.V.J., Hassan B. and Mohamed K. // Afr. J. Biotechnol. 2009. V. 8. № 7. P. 1258-1262.
2. Lategan C., Kellerman T., Afolayan A.F., Mann M.G., Antunes E.M., Smith P.J., Bolton J.J. and Beukes D.R. // Pharmaceut. Biol. 2009. V. 47. № 5. P. 408–413.
3. Kamei Y., Sueyoshi M., Hayashi K., Terada R., Nozaki H. // J Antibiot (Tokyo). 2009. V. 62. № 5. P. 259-263.

Конституциональные особенности детей с бронхиальной астмой

И.Ю. Марушенко

Амурская Государственная Медицинская

Электронная почта: ivanka_888@mail.ru

Вопрос о влиянии заболеваемости на процессы роста и развития детей не имеет однозначного ответа: некоторые исследователи полагают, что это влияние несущественно; другие, напротив, считают, что оно представляет серьезную проблему, так как болезнь является стрессовым эндогенным фактором.

До настоящего времени отсутствуют сведения о физических показателях детей, проживающих в Амурской области. Нет данных о взаимосвязи конституциональных типов детей с состоянием отдельных функциональных систем, в том числе и дыхательной. Заболевания органов дыхательной системы у детей в Амурской области занимают одно из лидирующих мест в структуре заболеваемости детского населения. Наиболее актуальной медико-социальной проблемой является бронхиальная астма.

Исследование проводилось с 2007 по 2009г. на базе детской консультативной поликлиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания. Всего обследовано 112 детей, проживающих в г. Благовещенске. Из них 69 мальчика и 43 девочки, что составляет 61,6% и 38,4% соответственно. Дети были разделены на следующие группы: дети с бронхиальной астмой и контрольная группа (практически здоровые дети). Антропометрические показатели детей были получены с помощью стандартного набора антропометрических инструментов: калипера, большого толстотного и скользящего циркулей, метрической ленты, медицинских весов и ростомера. При анализе физического статуса определялся компонентный состав тела путем определения абсолютного количества жировой, мышечной и костной ткани по формулам Матейки, а принадлежность к определенному соматотипу с помощью индекса Rees – Eisenck.

Результаты исследования. На основании полученных данных было проведено исследование сравниваемых групп по компонентному составу тела. Анализ полученных данных показал, что в обеих группах исследуемые соматические показатели в идентичны. Однако наблюдается относительное уменьшение жировой ткани в группе больных бронхиальной астмой. Используя индекс Rees – Eisenck в контрольной группе, установлены следующие соматотипы: пикнический, нормостенический и астенический. В группе детей с БА отсутствуют пикники.

Детальный анализ ростовых кривых показал, что для большинства антропометрических параметров линии, характерные для больных детей, располагаются несколько ниже аналогичных линий контрольной группы. Что может объясняться исходными задержками роста у больных детей под влиянием патологических процессов. Однако, несмотря на исходное ростовое запаздывание, характерное в целом для группы больных детей, у них в возрасте 5-6 лет наблюдается ускорение ростового процесса. Этот факт может быть объяснен с позиции «наверстывающего роста» как следствия успешных терапевтических мероприятий, подключения базисной терапии, применявшихся к детям с бронхиальной астмой. Контроль над бронхиальной астмой может существенно улучшить состояние здоровья детей, заметно ослабить тормозящий эффект воздействия патологического процесса, что в свою очередь может привести к нормализации ростового процесса.

Взаимодействие тритерпеновых гликозидов голотурий и их комплексов с холестерином со спленоцитами мыши

Е.С. Менчинская¹, Д.Л.Аминин²

¹Дальневосточный государственный университет,

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: mega14@inbox.ru

Целью работы являлось исследование биологической активности ряда тритерпеновых гликозидов, выделенных из голотурий *Cucumaria japonica* и *Cucumaria frondosa*, и их комплексов с холестерином. Изучали влияние этих соединений на жизнеспособность лимфоцитов селезенки мыши, влияние гликозидов и их комплексов с холестерином на активность внутриклеточного фермента неспецифическая эстераза, взаимодействие соединений с биомембранами лимфоцитов и их влияние на микровязкость биомембран.

В исследовании применялись методы работы с первичной культурой лимфоцитов мыши (спленоцитами), техника молекулярных флуоресцентных зондов, флуоресцентная спектроскопия и компьютерный анализ изображения клеток. Кукумариозид А₂-2, фрондозид А и их комплексы с холестерином в молярном соотношении 1:2 были получены и любезно предоставлены сотрудниками лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН.

Показано, что ингибирующая активность комплексов тритерпеновых гликозидов голотурий кукумариозид А₂-2 и фрондозид А с холестерином в отношении внутриклеточного фермента неспецифическая эстераза резко снижается по сравнению с индивидуальными гликозидами.

С помощью красителя трипановый синий установлено, что кукумариозид А₂-2 и фрондозид А проявляют сильное цитотоксическое действие. Их полумаксимальные эффективные концентрации (ЕС₅₀) равны 8 мкг/мл и 5 мкг/мл, соответственно, тогда как комплексы гликозидов с холестерином практически не цитотоксичны.

С помощью флуоресцентного зонда пирен установлено, что индивидуальные гликозиды кукумариозид А₂-2 и фрондозид А значительно увеличивают микровязкость биомембран спленоцитов, тогда как комплексы гликозидов с холестерином в концентрациях ниже 1 мкг/мл практически не влияют на микровязкость биомембран.

Экспрессия гена кальций-зависимой протеинкиназы *AtCPK1* активирует биосинтез антрахинонов в трансгенных культурах марены сердцелистной

И.В. Мишаков^{1,2}, Г.Н. Веремейчик¹, Ю.Н. Шкрыль¹

¹Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН

²Дальневосточный государственный университет

Электронная почта: un80@mail.ru

Кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK) играют ключевую роль в ответе растительной клетки на стрессовое воздействие или атаку патогена [1]. В ряде работ было высказано предположение о том, что представители этого семейства белков способны участвовать в регуляции вторичного метаболизма, как части защитной системы растений [2]. Целью данной работы являлось изучение действия представителя семейства генов CDPK, изоформы *AtCPK1* арабидопсиса на процессы роста и вторичного метаболизма растительной клетки.

Для эксперимента использовали два мутантных варианта гена *AtCPK1*: кальций-независимый и неактивный. Оба мутантных гена были успешно привнесены в геном культивируемых клеток марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.) путем агробактериальной трансформации. Экспрессия трансгенов была доказана при помощи обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В дальнейшей работе культуру, трансформированную геном неактивной формы *AtCPK1*, а так же нетрансформированную культуру использовали в качестве контрольных.

Химический анализ антрахинонов (АХ), основных вторичных метаболитов марены сердцелистной, показал, что экспрессия неактивной формы *AtCPK1* не оказывает значительного влияния на содержание АХ. Экспрессия кальций-независимой формы *AtCPK1* привела к десятикратному увеличению биосинтеза АХ в трансгенных клетках, содержание суммы АХ в них достигает 4,4 %. При этом исследованные мутантные формы *AtCPK1* не оказали значительного влияния на рост трансгенных клеток, по сравнению с нетрансформированной культурой.

При помощи метода ПЦР в реальном времени, мы изучили экспрессию гена изохоризматсинтазы марены (*RcICS1*), кодирующего ключевой фермент биосинтеза АХ [3]. Экспрессия *RcICS1* в клетках марены, трансформированных геном кальций-независимой формы *AtCPK1* была активирована в 8,3 раза по сравнению с нетрансформированными клетками и в 11 раз по сравнению с клетками, трансформированными геном неактивной формы *AtCPK1*.

Таким образом, на примере гена *AtCPK1*, мы впервые экспериментально показали, что кальций-зависимые протеинкиназы способны оказывать влияние на вторичный метаболизм растительной клетки. Изученная нами форма CDPK активировала накопление фитоалексинов марены - АХ, посредством активации экспрессии фермента биосинтеза АХ - изохоризматсинтазы. Этот результат дает основание предполагать, что *AtCPK1* арабидопсиса и гомологи этой формы CDPK в других растениях участвуют в регуляции защитных систем клеток.

1. Harmon A., Gribskov M., Gubrium E., Harper J. The CDPK superfamily of protein kinases // *New Phytol.* 2001. V. 151. P. 175–183.
2. Allwood E., Davies D., Gerrish C., Bolwell G. Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean // *Plant Mol. Biol.* 2002. V. 49. P. 533–544.
3. Tegelen L., Moreno P., Croes A., Verpoorte R., Wullems G. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus* // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 705-712.

Поведение клеточных органелл при цитомиксисе

С.Р. Мурсалимов¹

¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН
Электронная почта: mursalimovsr@gmail.com

Цитомиксис – это перемещение клеточного содержимого (цитоплазмы, органелл и ядра) из одной клетки в другую по особым цитомиктическим каналам (рис.1). Это явление встречается у многих видов растений, чаще всего в материнских клетках пыльцы (МКП). Так как в результате цитомиксиса в отдельных МКП может возникнуть избыток (или недостаток) хроматина, то вполне возможно ожидать появления среди таких растений отдельных форм с измененным числом хромосом (поли- и анеуплоиды, растений с В-хромосомами).

Трансгенные растения табака линии Res79 ($2n=96$), проявляющие высокий уровень цитомиксиса в МКП, были использованы как модельный объект для изучения этого явления.

На линии Res 79 исследования проводили на ультраструктурном уровне с применением стандартных методик (в качестве контроля использовали линию табака SR1). Показано, что цитомиктические каналы могут образовываться двумя путями: при разрушении плазмодесм и *de novo* с помощью специфических электронноплотных тел.

Установлено, что ядро (рис.1), а также другие клеточные органеллы (митохондрии и пластиды) не получают повреждений при перемещении через цитомиктические каналы, не смотря на значительную степень сжатия при переходе. Хроматин, переходящий в составе ядра также не получает каких либо повреждений и после сжатия восстанавливает свою исходную структуру в реципиентной клетке.

Интересным моментом при цитомиксисе является поведение ядрышка, при переходе ядра через цитомиктический канал оно меняет свою форму, чтобы пройти через узкое пространство канала, а затем в реципиентной клетке оно восстанавливает свою исходную форму и может отделиться от ядра и сформировать свое ядрышковое микроядро, в котором возможно еще какое-то время продолжается синтез РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ: 08-04-01046

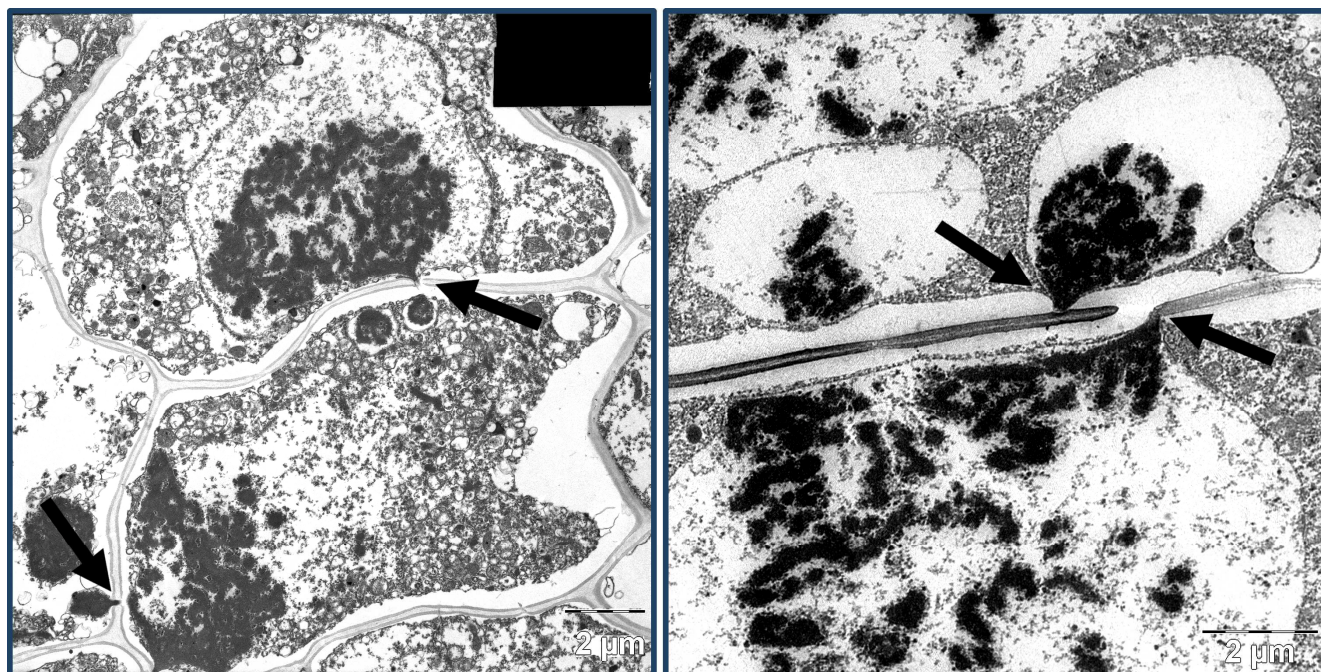


Рисунок 1. Цитомиксис в мейоцитах табака (стрелками указан хроматин перемещающийся между соседними мейоцитами сквозь клеточную стенку на стадии пахитены-диплотены)

Защитные покрытия на сплавах магния, полученные с применением наноматериалов

М.В. Нистратова, Д.В. Машталяр, С.Л. Синебрюхов, В.С. Егоркин, С.В. Гнеденков
Институт химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: sea...girl@mail.ru

Перспектива использования магниевых сплавов в авто- и авиапромышленности, ракетостроении, космической технике, а также в электронном оборудовании связана с их конструкционными свойствами: низкой плотностью, высокой прочностью, легкостью в обработке. Низкая износостойкость и сопротивляемость коррозии в настоящее время не позволяют магниевым сплавам конкурировать со сталью и сплавами алюминия. Для предотвращения коррозии и износа деталей из магниевых сплавов, необходимо создание на их поверхности эффективных защитных покрытий.

Существует несколько способов защиты магниевых сплавов от коррозии, такие как анодирование, газоплазменное напыление, получение гальванических покрытий. В настоящее время одним из наиболее перспективных способов формирования на магниевых сплавах поверхностных защитных слоев, обладающих высокой адгезией к подложке и низкой пористостью, является метод плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) [1–3].

Целью данной работы являлся поиск оптимального состава электролита и режимов ПЭО для получения на магнии защитных оксидных покрытий, а также изучение их физико-химических свойств, включающее оценку антикоррозионных свойств, фазового, элементного составов, механических свойств (микротвердость, модуль Юнга) и морфологии поверхности.

В работе рассматривалось воздействие режимов формирования на физико-химические свойства покрытий, полученных в различных режимах ПЭО.

В состав электролита для ПЭО, помимо силикатно-фторидных соединений, необходимых для формирования защитной пленки, вводили поверхностно активные вещества (ПАВ) для обеспечения большей подвижности ионов электролита во время процесса оксидирования. Известно, что оксид алюминия обладает высокой твердостью и химической инертностью. В связи с этим можно предположить, что присутствие наночастиц Al_2O_3 в покрытии, будет способствовать улучшению антикоррозионных и механических свойств. Для этого в состав электролита вводили нанопорошок Al_2O_3 .

По результатам исследования толщина покрытия, сформированного в силикат-фторидном электролите, составляет 9–12 мкм, а при введении в электролит ПАВ и нанопорошка Al_2O_3 толщина покрытия увеличивается до 16–18 мкм, при этом качественно изменяется морфология покрытия: формируется более однородный слой с низкой пористостью, причем поры, как правило, узкие, не сквозные.

Согласно данным рентгенофазового анализа покрытие, полученное в силикат-фторидном электролите с добавлением наночастиц, состоит из оксида и отросиликата магния. Однако анализ результатов исследования методом микрозондового анализа показал, что в состав покрытия входят также соединения фтора и алюминия.

Коррозионные испытания, проведенные постоянно- и переменноточковыми методами исследования, а также измерения микротвердости показали, что покрытие, полученное в биполярном режиме ПЭО в силикат-фторидном электролите с добавлением нанопорошка Al_2O_3 и ПАВ, обладает повышенными антикоррозионными и механическими свойствами по сравнению с покрытием, полученным в силикат-фторидном электролите.

1. Шатров А.С. // Коррозия: материалы, защита. 2004. V 11. P 23–28.

2. Shi Z., Song G., Atrens. A. // Corros. Sci. 2006. V 48. P 3531–3537.

3. Гнеденков С.В., Хрисанфова О.А., Синебрюхов С.Л., Пузь А.В., Гнеденков А.С. // Коррозия: материалы, защита. 2007. V 2. P 20–25.

Прогресс в структурных исследованиях липополисахаридов бактерий рода *Providencia*

О.Г. Овчинникова¹, Н.А. Кочарова¹, А.А. Пархомчук¹, А.Н. Кондакова¹, А.С. Шашков¹,
Ю.А. Книрель¹, А. Рожальски²

¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

²Институт микробиологии и иммунологии, Университет Лодзи, Лодзь, Польша

Электронная почта: olga.ovchinnikova@gmail.com

Рода *Providencia*, *Morganella* и *Proteus* принадлежат к трибе *Proteeae* семейства энтеробактерий. При благоприятных условиях штаммы этих бактерий вызывают воспаления кишечного тракта и мочеполовых путей. Существующая серологическая классификация, используемая для серотипирования клинических изолятов *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rustigianii* и *Providencia stuartii*, насчитывает 63 O-серогруппы. Эта классификация основана на сероспецифичности O-антигенных липополисахаридов (ЛПС), которые являются основным компонентом внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий и рассматриваются как один из факторов их вирулентности.

В настоящей работе изучено строение ЛПС 39 O-серогрупп *Providencia*. Мягким кислотным гидролизом ЛПС S-, R- и SR-типа отделяли липидную часть и получали высокомолекулярный O-полисахарид и олигосахариды незамещенного кора и кора с одним повторяющимся звеном, которые разделяли с помощью гель-хроматографии. Структурный анализ O-полисахаридов проводили химическими методами и двумерной спектроскопией ЯМР. Олигосахариды анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и на основании этого скрининга отбирали образцы для более детального исследования с помощью спектроскопии ЯМР. В результате определено строение O-полисахаридов 33 серогрупп, а для ряда серогрупп установлены полные структуры ЛПС, включая строение кора, биологического повторяющегося звена O-полисахарида и место присоединения O-полисахарида к кору.

Накопленные данные о строении O-полисахаридов *Providencia* позволили выявить определенные особенности этих биогликанов, такие как распространенность в их составе неуглеводных компонентов и необычных моносахаридов, включая 6-дезоксигексозы, 6-дезоксигексозамины и высшие альдулозоновые кислоты. Обращает на себя внимание присутствие в различных O-полисахаридах некоторых неуглеводных компонентов в двух стереоизомерных формах, как например, N-связанные D- и L-аспарагиновая кислота, N^ε-[(R)- и (S)-1-карбоксиэтил]-L-лизин, простые эфиры (R)- и (S)-молочной кислоты, (2R,4R)- и (2S,4R)-2,4-дигдроксипентановой кислоты. Существенно, что необычные сахара и их производные занимают терминальное положение на невосстанавливаемом конце полисахаридной цепи, что делает их наиболее доступными для взаимодействий с другими биологическими системами, включая иммунную систему. Разнообразие и уникальность моносахаридных и неуглеводных компонентов O-полисахаридов помогают условно-патогенным бактериям *Providencia* преодолевать защитные барьеры организма-хозяина и, таким образом, способствуют развитию инфекционных процессов.

Работа поддержана РФФИ (грант № 08-04-92221-ГФЕН).

Влияние биологически активных добавок, содержащих пектины, на воспалительный статус

Н.М. Падерин

Институт физиологии КомиНЦ Уральское отделение РАН

Электронная почта: paderin_nm@mail.ru

Биологически активные добавки, содержащие пищевые волокна, например пектины, давно применяются как бактерицидные энтеросорбенты и пребиотики. Однако было показано, что пектины обладают превентивным противовоспалительным эффектом при пероральном введении. Судить о воспалительном статусе в организме можно по концентрации С-реактивного белка в крови. Известно, что риск инфаркта миокарда выше у людей, в крови которых наблюдается высокая концентрация С-реактивного белка (СРБ). Концентрация СРБ повышается при пародонтите, воспалении околозубных тканей. Успешное лечение пародонтита эндогенным ингибитором миграции лейкоцитов, резолвином Е1, обусловлено снижением миграции лейкоцитов в очаг воспаления. При депрессивном состоянии концентрация кортизола в плазме крови снижается, что сопровождается увеличением содержания маркеров воспаления, что в свою очередь приводит к повышению риска сердечно-сосудистых заболеваний. Однако влияние пектиновых пищевых добавок на воспаление изучено не было.

Цель данной работы – определение влияния пищевых добавок, содержащих пектины, на воспалительный статус практически здоровых людей.

В исследовании приняли участие 9 добровольцев, 4 мужчин и 5 женщин (средний возраст 26.6 ± 4.2 года). В качестве пектиновых биологически активных добавок использовали “Пробаланс” (ООО “Фармакор продакшн”) и “Пектовит” (ИП Тхакаров Р.Ж. совместно с ООО “Пектиновые продукты”). Добровольцы принимали пищевые добавки в течение 2 дней, согласно инструкции производителей.

Забор крови, слюны и смыва полости рта осуществляли в утренние часы, строго натощак. В образцах крови и смыва полости рта подсчитывали количество лейкоцитов при помощи камеры Горяева. Концентрацию кортизола определяли иммуноферментным анализом, в крови при помощи набора СтероидИФА-кортизол-01 (Алкор Био), в слюне – Salivary Cortisol ELISA (DRG). Содержание СРБ в плазме крови определяли иммунотурбидиметрическим способом при помощи набора CRP U-hs FS (DiaSys).

Статистическую обработку результатов производили с использованием непараметрического парного критерия Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Концентрация СРБ в крови значительно уменьшилась в 1.5 раз у людей, принимавших “Пробаланс”, и не изменилась после приема “Пектовит”. Значимых изменений в количестве лейкоцитов и концентрации кортизола в крови людей, после приема пищевых добавок, не обнаружено.

Содержание кортизола в слюне значительно увеличилось на 13%, после приема добровольцами биологически активной добавки “Пробаланс”. Количество мононуклеарных лейкоцитов в смыве ротовой полости уменьшилось в 1.8 раз, а число полиморфноядерных лейкоцитов значительно не изменилось после приема “Пробаланс”. После приема пищевой добавки “Пектовит” количество лейкоцитов в смыве ротовой полости и концентрация кортизола в слюне значительно не изменились.

Таким образом, биологически активные добавки, содержащие пектины, могут использоваться не только для улучшения функционального состояния желудочно-кишечного тракта, но и как профилактические средства, снижающие воспалительный статус.

Исследования выполнены при поддержке Конкурса научных проектов молодых ученых и аспирантов УрО РАН 2009 года.

Компьютерное определение гомологии апротинина и ингибитора соевого трипсина

И.Э. Памирский, М.А. Штарберг, Е.А. Бородин
 Амурская государственная медицинская академия
 Электронная почта: quigly@mail.ru

Чрезмерная активация протеолиза является одним из факторов патогенеза, например, воспаления. Среди фармпрепаратов – ингибиторов протеолиза, наиболее востребован апротинин (АПР) – поливалентный ингибитор трипсина, выделяемый из органов крупного рогатого скота, и используемый для профилактики и лечения панкреатита, панкреонекроза, кровотечений, сопряженных с гиперфибринолизом. АПР имеет ряд серьезных недостатков: аллергические реакции вплоть до анафилактического шока; вероятность внесения в организм инфекции, характерная для животных белков; высокая цена. Поэтому поиск ингибиторов протеолиза лишенных таких недостатков является актуальной задачей. Одним из подходов к решению этой задачи является исследование возможности использования растительного ингибитора трипсина из сои (СИТ). Нами было проведено сравнительное исследование АПР и СИТ, на начальном этапе которого использовались методы биоинформатики. В данной статье приводится часть данных компьютерного исследования АПР и СИТ. Мы определяли гомологию АПР и СИТ при помощи интернет-сервера BLAST и программы BioEdit 5.0.9, в которых принцип подсчета гомологии заключается в выравнивании последовательностей белков и сравнении эквивалентных аминокислотных остатков [1]. Определение гомологии сервер BLAST показало, что данные белки не являются схожими. BioEdit показала, что полипептидные цепи данных ингибиторов гомологичны на 10%. Низкое сходство на уровне целых молекул было ожидаемым результатом, и объясняется отличием в длине полипептидных цепей АПР и СИТ (АПР – 58 аминокислот, СИТ – 181). Отдельные участки цепей АПР с СИТ имеют более высокий уровень гомологии (рис. 1). Так сходство N-концевой области СИТ (участок цепи 5-60) и АПР без 2-х крайних N-концевых аминокислот составила 21%. Участок цепи 85-116 СИТ и 25-56 АПР схожи на 24%. Наиболее гомологичными (35%, сходство обнаружено по 16 парам аминокислотных остатков) оказались С-концевая область СИТ (132-181) и цепи АПР без 6 последних С-концевых аминокислот. Результаты со сходством свыше 30%, эквивалентны по точности рентгеноструктурному исследованию [2]. Родственные белки, независимо от количества аминокислот, входящих в их состав, и различий третичной структуры, имеют одинаковые (консервативные) области (домены), определяющие функциональность белков. Например, в родственных глутамилэндопептидазах бактерий неизменны – консервативны только пять аминокислотных остатков из 215 [3].

Aprotinin	1	~RDFCLEPPYTGPECKARMIKYFYNIERSRSCEEFYGGCEAKKNNFEAMEDCMRTCGGA	58
SBTI	1	DFVLDNEGMELENGSTYYIISDITAFGGIRBAAPTGNERCPLTVVCSRNELLKGLSTIIS	60
Aprotinin	1	RDFCLEPPYTGPECKARMIKYFYNIERSRSCEEFYGGCEAKKNNFEAMEDCMRTCGGA	58
SBTI	61	PYRIRFIAEGHPLSLKFDSPAVIMICVGIPTEMSVVVDLEESPAVKIGENKAMDGMFRL	120
Aprotinin	1	RDFCLEPPYTGPECKARMIKYFYNIERSRSCEEFYGGCEAKKNNFEAMEDCMRTCGGA	58
SBTI	132	KLVFCECSQAEDDKCEDIGTISIDHDDGIR---LVVSKNEPLVVCCKLLDKESI-----	181

Рис. 1. Гомология участков АПР (Aprotinin) и СИТ (SBTI). Черные - идентичные, серые – подобные аминокислоты.

Таким образом, полученные нами данные позволяют рассматривать исследуемые ингибиторы как однотипные белки, что явилось одной из предпосылок дальнейшего исследования *in vitro* и *in vivo*.

1. Pazos F., Bang J.-W. // Current Bioinformatics. 2006. Vol. 1. P. 15-23.
2. Xiang Z. // Curr. Protein Pept. Sci. 2006. Vol. 7, № 3. P. 217-227.
3. Степанов В.М. // Росс. ж-л гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 1998. № 1. С. 37-41.

Изучение перекрестной реактивности лектина мидии *Crenomytilus grayanus* с белками лимфы и мантии двустворчатых моллюсков

М.Е. Панкова¹, М.С. Кокоулин¹, Д.А. Сахаров¹, Ю.П. Штода¹, И.В. Чикаловец²

¹Дальневосточный государственный университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: ivchik6@mail.ru

Лектины – широко распространенные белки и гликопротеины, способные специфически и обратимо связывать углеводные структуры. Лектины принимают участие в тонких процессах на клеточном, субклеточном и органном уровнях в живых организмах. Получены данные, указывающие на то, что, функционируя в качестве факторов, узнающих и связывающих чужеродный материал, лектины морских беспозвоночных участвуют в неспецифических иммунных реакциях. Поэтому поиск, выделение и изучение новых лектинов из беспозвоночных, особенно морских, которые, как известно, обладают высокой степенью филогенетического консерватизма, представляет несомненный интерес.

Ранее из мидии *Crenomytilus grayanus* был выделен и охарактеризован Gal/GalNAc – специфичный лектин (CGL) [1]. Показано, что он принимает участие в реакциях врожденного иммунитета животных [2]. Целью работы было изучение перекрестной реактивности CGL с белками лимфы и мантии других двустворчатых моллюсков, собранных в бухте Троица Японского моря. Методом гемагглютинации (ГА) определен титр ГА. Показано, что лектины обнаружены во всех исследуемых образцах гемолимфы и в половине экстрактов мантии. Перекрестную реактивность (ПР) изучали методом иммуноферментного анализа. Выявлена ПР между CGL и белками трех исследуемых образцов.

Вид моллюска	ПР (%)		Титр (ГА)	
	гемолимфа	мантия	гемолимфа	мантия
<i>Crenomytilus grayanus</i>			1:8	1:4
<i>Mytilus trossulus</i>	11	2.5	1:16	1:8
<i>Modiolus difficilis</i>	15	5	1:32	1:16
<i>Glycymeris yessonensis</i>	10	—	1:128	1:128
<i>Arca boucardi</i>	—	—	1:2048	НА
<i>Anadara broughtoni</i>	—	—	1:8	НА
<i>Callista brevisiphonata</i>	—	—	1:2	НА
<i>Spisula sachalinensis</i>	—	—	1:4	НА
<i>Macra chinensis</i>	—	—	1:16	НА
<i>Mya japonica</i>	—	—	1:16	1:128
<i>Peronidia venulosa</i>	—	—	1:32	НА

НА- нет агглютинации

Следует отметить, что эти образцы получены из мидий, принадлежащих к тому же отряду, что и мидия *Crenomytilus grayanus* (Mytilida), а два из трех образцов даже относятся к тому же семейству (Mytilidae). Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными о высокой степени гомологии между лектинами, выделенными из близких видов животных или растений.

1. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V., Skobun A.S., Glazkova V.E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Comp. Biochem. Physiol. 1998. V. 119C. P. 45-50.

2. Чикаловец И.В., Черников О.В., Корнейчук Н.Г., Молчанова В.И. Роль лектина CGL во врожденном иммунитете мидии *Crenomytilus grayanus* // Рос. иммунол. журн. 2008. Т. 2, № 2-3. С. 163.

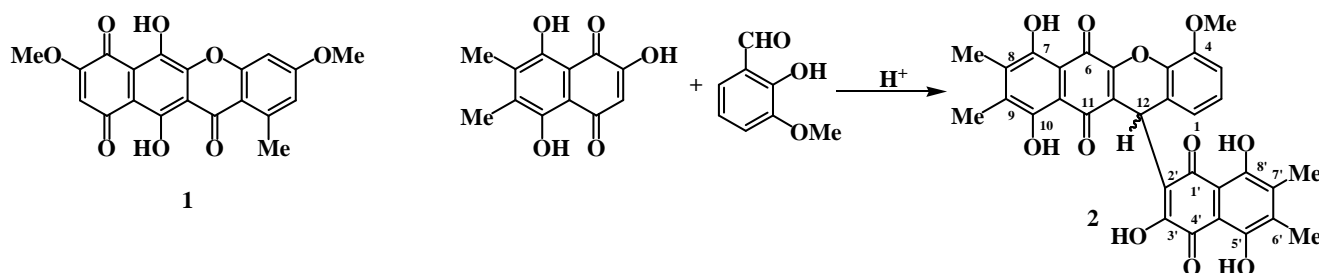
Синтез аналога бикаверина (6, 11-дигидрокси-8,9-диметил-4-метоксибензо[b]ксантен-7,10,12-триона) – метаболита некоторых грибов родов *Fusarium*, *Gibberella* и *Mycogone*

Д.Н. Пелагеев, В.Ф. Ануфриев

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

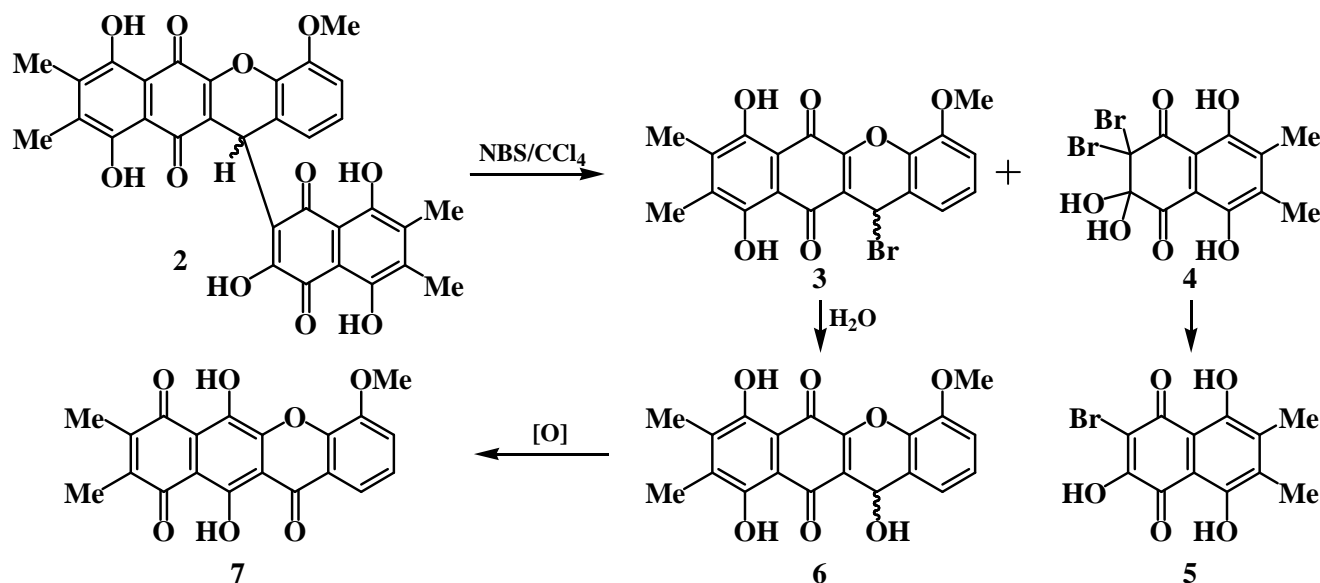
Электронная почта: pelageev@riboc.dvo.ru

Бикаверин (**1**) – красный пигмент, выделенный из культур грибов *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Mycogone jaarii*^{1,2}, обладает высокой биологической активностью.^{3,4} К настоящему времени в литературе описано несколько его синтезов.⁵⁻⁷ Эти синтезы являются многостадийными и основываются на использовании труднодоступных реагентов.



Ранее нами было установлено, что 2-гидрокси-нафтазарин (2,5,8-тригидрокси-1,4-нафтохиноны) в условиях мягкого кислотного катализа образуют с 2-гидроксибензальдегидами производные 7,10-дигидрокси-12Н-бензо[b]ксантен-6,11-диона **2**.⁸ Эти пиранобиснафтазарин могут являются удобными субстратами в синтезе биологически активных бензоксантонов, что было показано нами на примере аналога бикаверина (6,11-дигидрокси-8,9-диметил-4-метоксибензо[b]ксантен-7,10,12-триона) **7**.

При бромировании N-бромсукцинимидом пиранобиснафтазарин **2** расщепляется до бромида **3** и 2-бром-3-гидрокси-нафтазарина **5**, образование которого идёт через геминальный дибромид **4**. Бромид **3** быстро гидролизует до ксантгидрола **6**. Окисление последнего даёт ксантон **7**.



1. Kjaer D., Pedersen C., Bu'Lock J. D., Smith J. R. // J. Chem. Soc. (C). 1971. P. 2792-2797. 2. Brewer D., Arsenault G. P., Wright J. L. C., Vining L. C. // J. Antibiot. 1973. V. 26. P. 778-781. 3. Balan J., Fуска J., Kuhr I., Kuhrova V. // Folia Microbiol. 1970. V. 15. P. 479-484. 4. Fуска J., Ivanitskaya L. P., Makukho L. V., Volkova L. Y. // Antibiotiki. 1974. V. 19. P. 890-893. 5. Barton D. H. R., Cottier L., Freund K., Luini F., Magnus P. D., Salazar I. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1976. P. 499-503. 6. Katagiri N., Nakano J., Kato T. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1981. P. 2710-2716. 7. Koning C.B., Giles R.G.F., Engelhardt L.M., White A.H. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1988. P. 3209-3216. 8. Пелагеев Д.Н., Ануфриев В.Ф. // Изв. Акад. наук. Сер. хим. 2008. С. 2288-2291.

Содержание ФНО- α и его растворимых рецепторов в сыворотке крови пациентов с циррозом печени и его сочетании с ХОБЛ

Т.Л. Пестрикова¹, В.А. Невзорова¹, И.В. Чикаловец², П.А. Лукьянов², О.В. Голотина¹

¹Владивостокский государственный медицинский университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: pestriktl@mail.ru

Хроническое воспаление играет важную роль в развитии патологических изменений как при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), так и при циррозе печени (ЦП). Воспалительный процесс сопровождается не только увеличением продукции ряда цитокинов, но и нарушением тонкого баланса между отдельными цитокинами, между лигандами и их рецепторами, рецепторными антагонистами. ФНО- α и его растворимые рецепторы являются маркерами активации макрофагов, купферовских клеток и процессов фиброза при циррозе печени.

Цель: Оценить активность воспалительного процесса по содержанию провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) и его растворимых рецепторов (SR1 и SR2) в сыворотке крови у пациентов с ЦП, с ХОБЛ в сочетании с ЦП и с изолированной ХОБЛ.

Материалы и методы: Пациенты были разделены на 3 группы: 1-я группа (n = 48) – пациенты с ЦП, 2-я группа (n = 23) – пациенты с ХОБЛ в сочетании с ЦП, 3-я группа сравнения (n = 20) – пациенты с изолированной ХОБЛ; контрольную группу составили 15 добровольцев. Концентрацию ФНО- α и его растворимых рецепторов в сыворотке крови определяли твердофазным иммуоферментным методом с использованием высокочувствительной тест-системы («R&D» systems Inc., США).

Результаты: Показатели содержания ФНО- α в сыворотке крови пациентов 1-й и 2-й группы достоверно не различались между собой (22,7 \pm 9,6 пг/мл и 19,4 \pm 7,2 пг/мл, p>0,05) однако, были достоверно выше по сравнению с контролем (4,9 \pm 6,6 пг/мл, p<0,001), что указывает на активность воспалительного процесса при ЦП. Уровень ФНО- α в сыворотке крови в группе пациентов с изолированной ХОБЛ был выше по сравнению со здоровыми лицами (44,2 \pm 14,2 пг/мл и 4,9 \pm 6,6 пг/мл, p<0,001) и с 1-й и 2-й группами пациентов (44,2 \pm 14,2 пг/мл и 22,7 \pm 9,6 пг/мл, 19,4 \pm 7,2 пг/мл, p<0,05).

При анализе содержания растворимых рецепторов ФНО- α в сыворотке крови наблюдалась сверхпродукция растворимого рецептора SR1 ФНО- α в обеих группах пациентов с ЦП по сравнению с контролем (1492,9 \pm 313,9 пг/мл, 1390,7 \pm 188,4 пг/мл и 681,0 \pm 240,8 пг/мл, p<0,001) и с изолированной ХОБЛ (1020,8 \pm 239,1 пг/мл, p<0,05), однако, показатели растворимого рецептора SR1 ФНО- α 1-й и 2-й группы достоверно не различались (p>0,05). При сравнении показателей растворимого рецептора SR2 ФНО- α , мы установили при ЦП и его комбинации с ХОБЛ наиболее высокое содержание этого рецептора по сравнению с контролем (8354,1 \pm 3617,6 пг/мл, 6398,1 \pm 2084,0 пг/мл и 2588,8 \pm 703,7 пг/мл, p<0,001) и с группой сравнения (4039,8 \pm 1633,5 пг/мл, p<0,05).

Заключение: Таким образом, при циррозе печени, его сочетании с ХОБЛ и при изолированной ХОБЛ наблюдается повышение уровня провоспалительного цитокина ФНО- α и его растворимых рецепторов SR1 и SR2 в сыворотке крови по сравнению со здоровыми лицами. Наиболее высокие цифры ФНО- α установлены при изолированной ХОБЛ, тогда как при циррозе печени и его комбинации с ХОБЛ наблюдается повышение уровней его растворимых рецепторов, что указывает на высокую значимость активности синтеза рецепторного звена при воспалительной реакции при ЦП.

Хирургическая и вариантная анатомия лицевого нерва человека

М.С.Пискун, А.В. Сергиенко, О.Ю. Шарапов
Амурская Государственная Медицинская Академия
Электронная почта: artmax@inbox.ru

Целью настоящего исследования было изучение синтопии внечерепной части лицевого нерва и вариантов его прохождения. Она была продиктована тем, что n. facialis находится в сфере интересов врачей многих специальностей – неврологов, оториноларингологов, нейрохирургов, стоматологов, физиотерапевтов и т.д..

Работа выполнена на материале 21 трупа плодов, детей и взрослых людей. Основным методом изучения послужила макро-микропрепаровка.

Исследование показало, что после выхода из шило-сосцевидного отростка у плодов и новорожденных основной ствол лицевого нерва располагается почти горизонтально, в то время как у взрослых он направлен сверху вниз, сзади наперед, из глубины наружу, проецируясь, в среднем, на 6,1 мм выше линии, соединяющей сосцевидный отросток с углом нижней челюсти.

Основной ствол лицевого нерва сразу же проникает в околоушную слюнную железу. Первый отрезок n. facialis лежит в зачелюстной ямке на глубине 15-20 мм, и отделяется здесь от глубже расположенной внутренней яремной вены шиловидным отростком. После пересечения наружной поверхности шиловидного отростка лицевой нерв проникает в околоушную железу.

Первоначально он идет книзу, затем круто восходит и, направляясь кпереди и кнаружи становится, более поверхностным.

Изучение нашего материала позволило выявить сетевидную и магистральную формы строения лицевого нерва. В первом случае, в околоушной железе он отдает две главных ветви – верхнюю (височно-лицевую) и нижнюю (челюстно-лицевую). При рассыпной форме строения количество ветвей возрастает от 3 до 5-ти. При этом верхняя ветвь самая крупная и является продолжением основного ствола. Она восходит косо по направлению к нижне-наружному краю орбиты. Конечные его ветви выходят из под переднего и верхнего краев околоушной железы.

Изучение синтопии лицевого нерва выводного протока околоушной слюнной железы показало, что в 65% случаев ветви n. facialis пересекали проток снаружи, в 22% случаев образует над ним сплетение и в 13% проток был свободен от нервных ветвей. Нижняя ветвь первоначально сопровождает основной ствол лицевого нерва, затем направляется к углу нижней челюсти. При этом шейная веточка нижней ветви пересекает заднюю лицевую вену. Выявлено, что в 80% случаев скуловые и щечные ветви взаимно анастомозируют, тогда как краевая ветвь анастомозирует с щечными лишь в 12% случаев.

**Взаимодействие тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 с
иммунокомпетентными клетками**

Пислягин Е.А.¹, Аминин Д.Л.²

¹Кафедра биохимии и биотехнологии АЭМББТ ДВГУ

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: pislyagin@hotmail.com

Целью настоящей работы являлось исследование взаимодействия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2, выделенного из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*, с биомембранами иммунокомпетентных клеток. В план работы входило исследование связывание этого соединения с биомембранами и его влияние на микровязкость биомембран лимфоцитов. Кроме того, было исследовано влияние кукумариозида А₂-2 на изменение мембранного потенциала перитонеальных макрофагов.

Для выполнения этой задачи использовались методические подходы с применением первичных культур иммунокомпетентных клеток мыши, техники молекулярных флуоресцентных зондов, флуоресцентной спектроскопии и компьютерного анализа флуоресцентного изображения клеток. Кукумариозид А₂-2 был получен и любезно предоставлен ведущим научным сотрудником лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. Авиловым С.А.

Было показано, что гликозид способен встраиваться в биомембраны спленоцитов, что приводит к увеличению микровязкости биомембран. Установлено, что степень изменения микровязкости биомембран находится в прямой зависимости от концентрации добавляемого в инкубационную среду гликозида. Максимальное увеличение микровязкости наблюдается при концентрации гликозида 1 мкМ, а минимальное – при 0.01 мкМ.

Взаимодействие тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 с перитонеальными макрофагами мыши вызывает изменение мембранного потенциала клеток и деполяризацию биомембран. Показано, что изменение мембранного потенциала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации гликозида в инкубационной среде.

Новый путь синтеза полигидрокси-1,4-нафтохинонов – биологически активных пигментов морских ежей

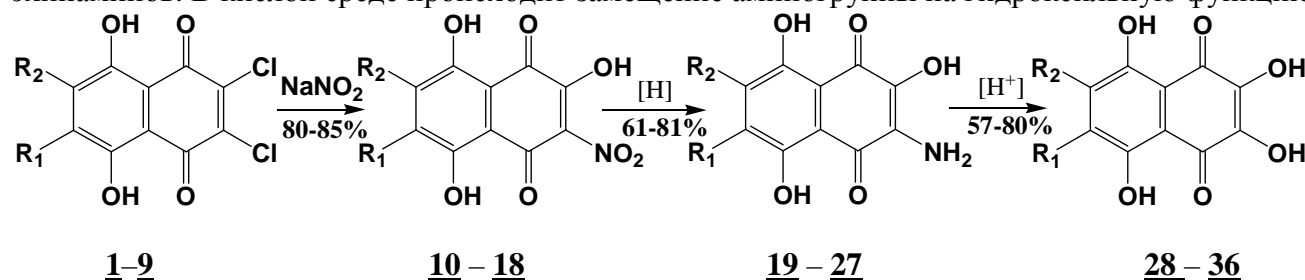
Н.С. Полоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: nikpol@riboc.dvo.ru

Полигидроксилированные нафтохиноны ряда нафтазарина (5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинона) - группа пигментов, представители которой выделены из растений, грибов, микроорганизмов и животных [1]. На основе одного из пигментов морских ежей - эхинохрома в ТИБОХ ДВО РАН создан лекарственный препарат Гистохром[®], применяющийся для лечения ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, травм и ожогов глаз. Недавно, из морского ежа *Scaphechinus mirabilis* были впервые выделены производные нафтазарина содержащие β-аминогруппу - эхинамины А и В [2]. Структуры эхинаминов установлены встречным синтезом. Эти соединения проявили антиоксидантную активность, сопоставимую с эхинохромом.

Нами предложен новый путь синтеза эхинамина А, родственных ему аминафтазаринов и 2,3-дигидроксиафтазаринов из доступных 2,3-дихлорнафтазаринов через введение в нафтазариновую систему NO₂ группы, способствующей активации соседнего атома хлора к нуклеофильному замещению и его легкой замене на гидроксил. Восстановление нитрогруппы приводит к 2-гидрокси-3-аминафтазаринам, - структурно родственным аналогам природных эхинаминов. В кислой среде происходит замещение аминогруппы на гидроксильную функцию.



Строение вновь полученных соединений доказано методами ЯМР ¹H-, ИК-спектроскопии и масс спектрометрии. Для известных соединений 27-31, 36 - путем сопоставления с заведомыми образцами.

Результаты конверсии 2,3-дихлорнафтазаринов 1-9 в спиназарины 28-36

Группы соединений	R ₁ , R ₂ / (выход, %)								
	H, H	H, Me	H, Et	Me, Me	Cl, Et	MeO, H	MeO, Me	MeO, Et	HO, Et
Дихлорхиноны	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
Нитрохиноны	<u>10</u> (79)	<u>11</u> * (83)	<u>12</u> * (85)	<u>13</u> (78)	<u>14</u> * (75)	<u>15</u> * (83)	<u>16</u> * (78)	<u>17</u> * (85)	<u>18</u> (60)
Аминохиноны	<u>19</u> (78)	<u>20</u> * (79)	<u>21</u> * (76)	<u>22</u> (80)	<u>23</u> * (78)	<u>24</u> * (81)	<u>25</u> * (73)	<u>26</u> * (80)	<u>27</u> (61)
Спиназарины	<u>28</u> (80)	<u>29</u> (70)	<u>30</u> (71)	<u>31</u> (72)	<u>32</u> (70)	<u>33</u> (50)	<u>34</u> (57)	<u>35</u> (55)	<u>36</u> (75)

Примечания:

*Смеси 6(7) изомеров

В ходе работы получены новые группы соединений: гидроксинитронафтазарины 10-18, аминогидроксиафтазарины 19-27 и 6,7-замещенные спиназарины 28-36. Синтезированы природные пигменты: эхинамин А 27, спиназарины 28-31 и эхинохром 36.

1. Thomson R.H. Naturally occurring quinones. London- New York: Chapman and Hall, 1987. 3rd ed. 732 P.; Blackie Academic and Professional, London - New York, 1997, 4th ed., 746 P.

2. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Pokhilo N.D., Anufriev V.Ph., Denisenko V.A., Glazunov V.P. // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. P. 1390-1393.

Комплексное лечение синдрома диабетической стопы

Ю.О. Полякова, В.В. Шимко
Амурская Государственная Медицинская Академия
Электронная почта: borodin@amur.ru

Синдром диабетической стопы (СДС) – патологическое состояние при сахарном диабете, возникающее на фоне поражения периферических нервов, мягких тканей, костей, проявляющееся острыми и хроническими язвами, костно – суставными поражениями и гнойно – некротическими процессами. СДС наблюдается у 20% - 40% больных сахарным диабетом. От 50% до 70% от общего количества выполненных ампутаций ног приходится на долю больных сахарным диабетом.

В клинической больнице № 3 г. Благовещенска нами проведено комплексное лечение больных сахарным диабетом средней степени тяжести в стадии декомпенсации с СДС, включающее лекарственную терапию, гипербарическую оксигенацию, лазерное воздействие.

Цель исследования: оценить эффективность применения низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и гипербарической оксигенации (ГБО) в комплексном лечении больных сахарным диабетом.

Методы исследования: исследование исходных показателей глюкозы капиллярной крови, липидного спектра плазмы крови, определение коэффициента атерогенности (КА). Лечение больных проводилось с использованием аппарата «Мулат», с применением одноразовых световодов с мощностью на конце 2 – 2.5Вт, барокамеры «Енисей - 3» при давлении 1.3 – 1.5 атм. с экспозицией 50 – 60 минут.

Было обследовано 32 пациента. Средний возраст составил 60 лет. У 85% пациентов были выявлены трофические язвы нижних конечностей. Все наблюдаемые были разделены на 3 группы в зависимости от проводимого лечения: 1-ю группу составили 12 пациентов, получающих традиционное лечение. Во 2-ю группу были включены 12 человек, в лечении которых дополнительно использовалось внутривенное облучение крови. Курс лечения составил 10 ежедневных процедур по 30 минут. В 3-ей группе больные (8 человек) получали кроме традиционной терапии НИЛИ в сочетании с ГБО. ГБО проводили ежедневно, в течение 10 дней.

Исходное состояние липидного спектра плазмы, коэффициент атерогенности у больных сахарным диабетом с СДС сравнивались с показателями 10 здоровых человек (контрольная группа). КА почти в два раза превышал параметры нормы.

При изучении липидного спектра крови установлено, что наибольший липокорректирующий эффект наблюдался у больных получавших НИЛИ в сочетании с ГБО. Так после проведенной терапии содержание ЛПНП снизилось на 29.9%, ЛПВП увеличились на 46.9%, уровень холестерина плазмы крови снизился на 26.6%, КА уменьшился на 57.1%. В 1-ой группе у больных содержание ЛПНП снизилось незначительно, содержание ЛПВП увеличилось до 0.87 ммоль/л, КА составил 5,6 отн. ед. У больных 2-ой группы уровень ЛПНП снизился на 23,3% от исходного, содержание ЛПВП увеличилось на 47,9%, уровень холестерина плазмы уменьшился на 28,5%, КА снизился на 52,6%. В 3-ей группе больных удалось добиться компенсации сахарного диабета на 5-7 сутки и заживления трофической язв в 60% на 12-15 сутки. Во второй и первой группе компенсация достигнута на 8-9 сутки, заживление трофических язв наблюдалось у 40% больных.

Таким образом, применение НИЛИ в сочетании с ГБО в комплексном лечении СДС способствует улучшению результатов лечения и может эффективно применяться при данной патологии.

Определение компонентов комплекса белка SUUR *Drosophila melanogaster*

О.В. Посух¹, А.А. Горчаков^{1,2}, А.А. Алексеенко², А.А. Юрлова¹

¹Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

²HHMI/ Harvard-Partners Center for Genetics and Genomics, Boston, MA, USA

Электронная почта: olga.posukh@gmail.com

Ген *Suppressor of UnderReplication (SuUR)* контролирует время завершения репликации и недорепликацию ДНК в гетерохроматиновых районах политенных хромосом *D. melanogaster*. Мутация в гене *SuUR* приводит к тому, что районы интеркалярного гетерохроматина и часть прицентромерного гетерохроматина заканчивают репликацию существенно раньше, чем в норме, и становятся полностью политенизированными. Несмотря на большой объем данных об эффектах белка SUUR, механизм его участия в контроле репликации до сих пор остается невыясненным. Наша работа направлена на поиск белков-партнеров и изучение функциональных комплексов белка SUUR.

Нами был выбран метод двойной аффинной очистки (TAP – Tandem Affinity Purification), который позволяет выделять белковые комплексы в условиях наиболее близких к *in vivo*. Работа по созданию такой системы для SUUR включала следующие этапы: (i) получение генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию в организме дрозофилы белка SUUR и полипептида TAP в одной рамке считывания; (ii) получение линии культуры клеток дрозофилы S2, стабильно экспрессирующей белок SUUR-TAP; (iii) получение линий мух, экспрессирующих белок SUUR-TAP. Для проверки функциональности системы был проведен ряд тестов. Была продемонстрирована способность химерного белка SUUR-TAP восстанавливать фенотип дикого типа в мутантной линии мух и оказывать специфические эффекты на хромосомы в системе экспрессии GAL4-UAS. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что химерный белок SUUR-TAP способен взаимодействовать с теми же белками-партнерами, что и эндогенный SUUR.

В результате фракционирования по размеру (FPLC) белковых комплексов из полученной линии культуры клеток и последующей детекцией белка SUUR-TAP было показано, что SUUR-TAP находится в составе крупных белковых комплексов (>440 кДа). Нами была проведена двойная аффинная очистка комплексов SUUR-TAP из белковых экстрактов полученной линии культуры клеток. Компоненты комплекса проанализировали при помощи масс-спектрометрии и выявили ряд белков – кандидатов в партнеры SUUR.

На следующем этапе работы предстоит проверка полученных взаимодействий генетическими методами. А также будет проведена двойная аффинная очистка комплексов белка SUUR-TAP из эмбриональных экстрактов дрозофилы, так как наибольшее количество SUUR обнаружено именно в эмбрионах.

Распространения гена Ксилозоизомеразы в пространстве видов бактерий

А.С. Розанов, К.В. Гунбин, С.Е. Пельтек

Новосибирский Институт Цитологии и Генетики СО РАН

Электронная почта: asroza@gmail.com

Бактериальное сообщество, в настоящее время, представляется не только как совокупность изолированных видов. Но и как сообщество видов и родов микроорганизмов, которые обмениваются между собой информационным полем в виде генетического материала. Такой обмен принято называть горизонтальным или латеральным переносом. Процесс перехода генов от одного вида к другому может сыграть значительную роль в дальнейшем видообразовании. Но для современных исследователей изучение распространения гена в пространстве геномов микроорганизмов позволяет проследить историю развития видов, как пример развитие молочных бактерий в результате появления млекопитающих.

В своей работе мы сравнили филогенетическое древо гена ксилозоизомеразы входящего в комплекс генов необходимых для усвоения ксилозы бактерией, и филогенетическое древо, построенное по гену 16s рибосомальной ДНК, отражающее филогенетическое родство между видами бактерий. В результате чего, мы получили картину распространения гена в пространстве видов бактерий. И обнаружили несколько фактов распространения гена ксилозоизомеразы не соответствующих общей филогенетической картине отношения между видами. И провели их некоторый анализ, с точки зрения экологического распространения.

Анализ соматических мутационных спектров в митохондриальной ДНК крыс линии Wistar

У.Н. Рощкая¹, И.Б. Рогозин¹, Е.А. Васюнина¹, Н.Г. Колосова¹, Б.А. Малярчук², Г.А. Невинский^{1,3}, О.И. Сеницина¹

¹Институт Цитологии и Генетики, Сибирское отделение РАН

²Институт биологических проблем Севера, Дальневосточное отделение РАН

³Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение РАН

Электронная почта: Ulyanar@mail.ru

Контрольный регион мтДНК, локализованный между генами тРНК пролина и фенилаланина, является наиболее высоко вариабельным участком мтДНК млекопитающих. Размер контрольного региона мтДНК крысы составляет примерно 900 пар нуклеотидов, хотя у других животных его размер может варьировать от 800 до более чем 5000 пар нуклеотидов. Известно, что контрольный регион мтДНК крыс различных лабораторных линий, включая аутбредную линию Wistar, является наиболее вариабельной частью митохондриального генома.

Нами были построены и проанализированы спектры соматических мутаций для контрольного региона мтДНК крыс Wistar 3 и 12 месяцев из вивария ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) и для крыс линии Wistar из питомника экспериментальных животных ФИБХ РАН (Пушино). Для построения спектров мутаций мы анализировали сегрегированные копии фрагмента мтДНК длиной 1260 нуклеотидов – от 15271 до 229 нуклеотида мтДНК, содержащие в своем составе контрольный регион мтДНК крысы. Общую частоту мутаций в данном фрагменте мтДНК определяли как отношение количества выявленных мутаций к количеству прочитанных оснований ДНК.

С возрастом у крыс происходит значительное увеличение частоты соматических мутаций. В 3 месяца частота мутаций в среднем составляет $5,5 \cdot 10^{-4}$ и к 12 месяцам увеличивается до $2,5 \cdot 10^{-3}$. При этом, в возрасте 12 месяцев все сегрегированные копии фрагмента мтДНК содержали мутации. Спектр соматических мутаций для мтДНК крыс линии Wistar (Пушино) (12 месяцев) подтвердил наличие гипермутационности в исследуемом районе. Таким образом, можно говорить о наличии гипермутационности в мтДНК крыс в 12 месячном возрасте.

Частота транзиций (G>A, C>T, A>G, T>C) в мутационных спектрах мтДНК крыс линии Wistar составила более 90% всех точечных замен. Что свидетельствует о том окислительные повреждения мтДНК, инициирующие преимущественно трансверсии, не являются основным источником образования соматических мутаций.

Известно, что одним из механизмов генерирования мутаций является дислокационный мутагенез, наблюдаемый в исследованиях *in vitro* для ряда ДНК полимераз, в том числе для ДНК-полимеразы гамма, которая реплицирует мтДНК. Наличие монотонно-повторяющихся последовательностей в ДНК (например, ...AAAA...) могут приводить к образованию нуклеотидных замен по механизму дислокационного кратковременного смещения. Анализ мутационных спектров мтДНК крыс линий Wistar (3 и 12 месяцев) выявил, что мутации у двух возрастов образуются по разным механизмам. В 3 месяца большая часть мутаций образовалась по пути дислокационного мутагенеза.

Работа поддержана грантами РФФИ (№№ 05-04-48779, 08-04-01027) и грантом президиума СО РАН для интеграционных исследований (№6). Секвенирование проведено на базе Межинститутского Центра Секвенирования СО РАН.

Фикобилипротеины- пигменты красных водорослей Японского моря

Ю.Е. Сабуцкий¹, А.В. Стоян¹, А.О. Барабанова²

¹ Институт химии и прикладной экологии, Дальневосточный государственный университет

² Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: anuta@piboc.dvo.ru

Красные водоросли являются источником широкого ряда биологически активных веществ. Наряду с сульфатированными полисахаридами, которые являются основными структурными компонентами этих водорослей, в состав клеточной стенки макрофитов входят пигменты фикобилипротеины, состоящие из фикоэритрина (РЕ), фикоцианина (РС), и аллофикоцианина (АЕС). Фикобилипротеины (ФБП) – комплексные соединения, в которых хромофорная группа пигмента, называемая фикобилином, ковалентно связанная с водорастворимым белком типа глобулина, представляет собой структуру, состоящую из четырех пиррольных колец, но не замкнутых, как в молекуле хлорофилла, а имеющих вид развернутой цепи, не содержащей металла (рис. 1).

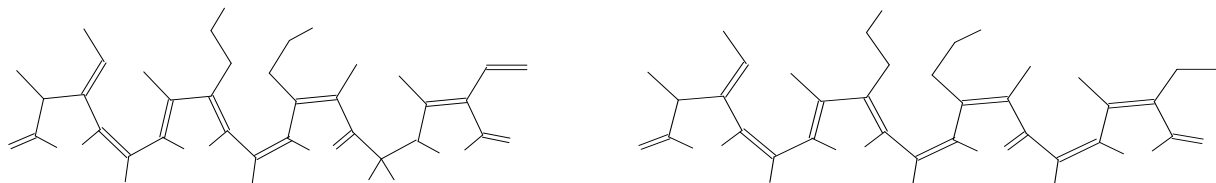


Рис.1. Структуры хромофорной части ФБП

Фикобилипротеины, благодаря яркой окраске и способности к флюоресценции, находят широкое применение в пищевой промышленности и биотехнологии.

Нами из семи видов водорослей, представителей семейств: Gigartinaceae, Rhodomelaceae, Ceramiaceae, Rhodumeniaceae и Tichocarpaceae, собранных в б. Троица залива Посыет (Японское море), экстракцией солевым раствором при рН 6 выделены фикобилипротеины и получены их спектральные характеристики. Установлено, что преобладающим пигментом всех водорослей является фикоэритрин, максимальное содержание которого обнаружено в *Ptilota filicinaa* (Ceramiaceae). Количество содержащихся в экстрактах фикоцианина и аллофикоцианина зависит от видовой принадлежности водоросли (рис.2)

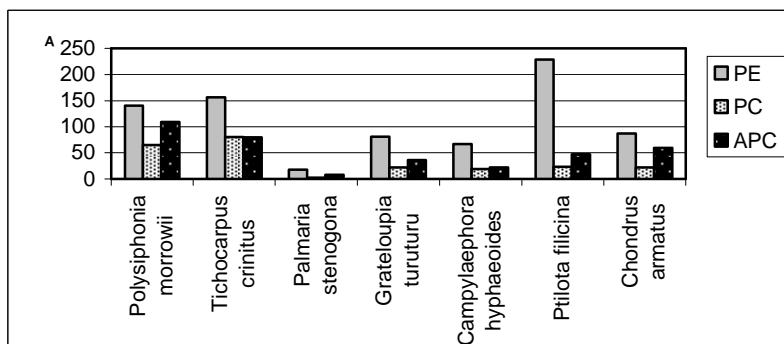


Рис.2. Содержание фикобилипротеинов в исследуемых водорослях.

Изучена возможность разделения фикобилипротеинов на составляющие компоненты методом гель-хроматографии на различных сорбентах. Показано, что наилучшее разделение фикобилипротеинов наблюдается при использовании фосфата кальция в качестве сорбента.

Изучение зависимости механических свойств от морфологии наноструктурированных гидрогелей хитозана с ксантаном

С.А. Сарин¹, Ю.А. Щипунов¹

¹*Институт Химии, Дальневосточное отделение РАН*

Электронная почта: zveroboy82@gmail.com

В последнее время в медицине, в пищевой промышленности, биотехнологии стали широко востребованы материалы с заданными механическими свойствами, обладающие биосовместимостью и низкой токсичностью. Этим условиям полностью удовлетворяют полисахариды природного происхождения.

Широкое применение получили материалы, формируемые на основе полиэлектролитных комплексов (ПЭК), образованных противоположно заряженными полимерами (полиэлектролитами). Их обычно получают смешением водных растворов анионного и катионного полиэлектролитов. При этом, как правило, происходит осаждение образовавшегося ПЭК, что не позволяет сформировать монолитный гидрогель [1]. В лаборатории предложен новый метод получения гидрогелей на основе хитозана с анионными полисахаридами, смешение которых не вызывает фазового расслоения [2]. Их свойства не были изучены до настоящего времени.

Целью данной работы являлось исследование взаимосвязи между механическими свойствами и морфологией гидрогелей, приготовленных по предложенному методу, на примере хитозана с ксантаном.

Смешение противоположно заряженных полисахаридов приводит к образованию гидрогелей при избытке хитозана и вязких растворов при избытке ксантана. Морфология гидрогелей была изучена с помощью сканирующей электронной микроскопии. Выявлено, что желирование растворов вызвано образованием фибриллярной сетчатой структуры, составленной из наноразмерных структурных элементов (фибрилл). Установлено, что их толщина изменяется от 25 до 100 нм, с изменением мольного соотношения полисахаридов. Исследование показало, что при избытке хитозана формируются гелевые системы, в которых сетчатая структура отсутствует. При увеличении в смеси доли ксантана формируется разветвленная наноструктурированная сетчатая структура с толщиной фибрилл 25-35 нм. При дальнейшем увеличении концентрации ксантана толщина фибрилл возрастает до 80-100 нм. Отметим, что по литературным данным, гидрогели на основе хитозана с ксантаном всегда проявляют фибриллярное строение, при этом толщина фибрилл составляет 100-300 нм.[3].

Механические свойства смесей хитозана с ксантаном были исследованы методом динамического механического анализа. Установлено, что системы, состоящие из фибрилл толщиной 25-35 нм, обладают наибольшей механической жесткостью. При переходе к системам с утолщенными фибриллами наблюдается заметное уменьшение жесткости гелей. Таким образом, показано, что механические свойства гелевых систем, сформированных противоположно заряженными полисахаридами, находятся в прямой зависимости от фибриллярной структуры.

1. Y.A. Shchipunov, N.A. Ivanova, S.A. Sarin // *Mendeleev Commun.* 2009. V.19. P. 149-151.

2. Y.A. Shchipunov, I.V.Postnova // *Composite Interfaces* 2009. V.16. P. 251-279(29)

3. D. Magnin, J. Lefebvre, E. Chornet, S. Dumitriu // *Carbohydrate Polymers* 2004. V.55. P. 437-453.

Использование трех ферментативных тест-систем для мониторинга экологического состояния бухты Троицы (Японское море)

А.В. Сейткалиева¹, Н.И. Мензорова², В.А. Рассказов²

¹Дальневосточный государственный университет

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: sasha0788@inbox.ru

Оценка качества морской среды в условиях антропогенного загрязнения решается посредством комплекса методологических подходов, среди которых все большее внимание уделяется изучению интегральной оценки токсичности среды с использованием, как живых объектов, так и различных биохимических параметров клеток.

Нами разработаны высокочувствительные экспрессные методы тестирования морской воды с использованием щелочных ДНКазы и фосфатазы из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и спектрофлуориметрический метод определения активности эстераз непосредственно на спермиях морского ежа. Все три метода по степени ингибирования ферментов дают возможность оценить суммарное влияние всей совокупности химических поллютантов органического и неорганического происхождения присутствующих в морской среде.

Целью данной работы является исследование качества проб морской воды с помощью ДНКазной, фосфатазной и эстеразной тест-систем и установление корреляции между результатами, полученными этими методами. Пробы воды были взяты в июле-августе 2008 и 2009 гг. на 10 станциях в акватории б. Троицы. Станция 1 (контрольная) расположена в открытой части моря, станции 2, 3 и 4 находятся в зоне воздействия бытовых отходов МЭС (б. Идола), туристического комплекса (б. Рисовая) и пос. Андреевка; на станции 5 (б. Тизи) обнаружено большое количество гниющей морской травы и металлолома; в районе станции 6 (б. Идола) продолжительное время находится затонувшая шхуна; станции 7 и 8 расположены в зоне порта Зарубино; станции 9 и 10 - на МЭС в районе водозаборного пирса и места забора морской воды для аквариальной.

Ранее, за “условную норму” качества морской воды нами было принято ингибирование ферментов менее чем на 10%, что указывает на отсутствие в среде факторов неблагоприятных для жизнедеятельности биоты. Вода, оцененная как “загрязненная”, ингибирует ферменты от 10 до 25%, “грязная” - от 25 до 50%, “очень грязная” - более чем на 50%. По результатам всех трех тестов показатели оценки качества поверхностных морских вод в открытом море (ст. 1), б. Идола (ст. 2) и МЭС (ст. 10) близки к “условной норме”. Качество воды в районе б. Рисовая (ст. 3), у пос. Андреевка (ст. 4), в районе б. Тизи (ст. 5), около затонувшей шхуны (ст. 6) и водозаборного пирса (ст. 9) оценивается как “загрязненная” по данным двух тестов. Такая ситуация может быть связана с многократным увеличением количества отдыхающих в летний период для станций 3 и 4, а для станций 5, 6 и 9 - с присутствием металлоконструкций и металлолома на дне участков исследуемых бухт. Как и следовало ожидать, самая неблагоприятная экологическая ситуация на акватории б. Троицы наблюдается в районе пос. Зарубино и особенно около причала большегрузных судов (ст. 7 и 8). Воду, взятую на этих станциях, можно оценить как “грязная” и “очень грязная”, что связано с загрязнением акватории, в первую очередь, тяжелыми металлами и нефтепродуктами порта Зарубино.

Сравнение результатов тестирования морской воды с помощью трех тест-систем показало, что наименее чувствительным к общим загрязнениям является эстеразный тест. Фосфатазная тест-система более чувствительна к присутствию в морской воде тяжелых металлов и нефтепродуктов, чем ДНКазная, однако, ДНКазы ингибируются более широким спектром химических соединений, чем фосфатаза.

Исследования загрязнения морской воды б. Троицы, проведенные в 2005 г и результаты, полученные в 2008 и 2009 гг., показали выраженную общую тенденцию к увеличению почти на всех станциях акватории, как биогенных, так и консервативных загрязняющих веществ.

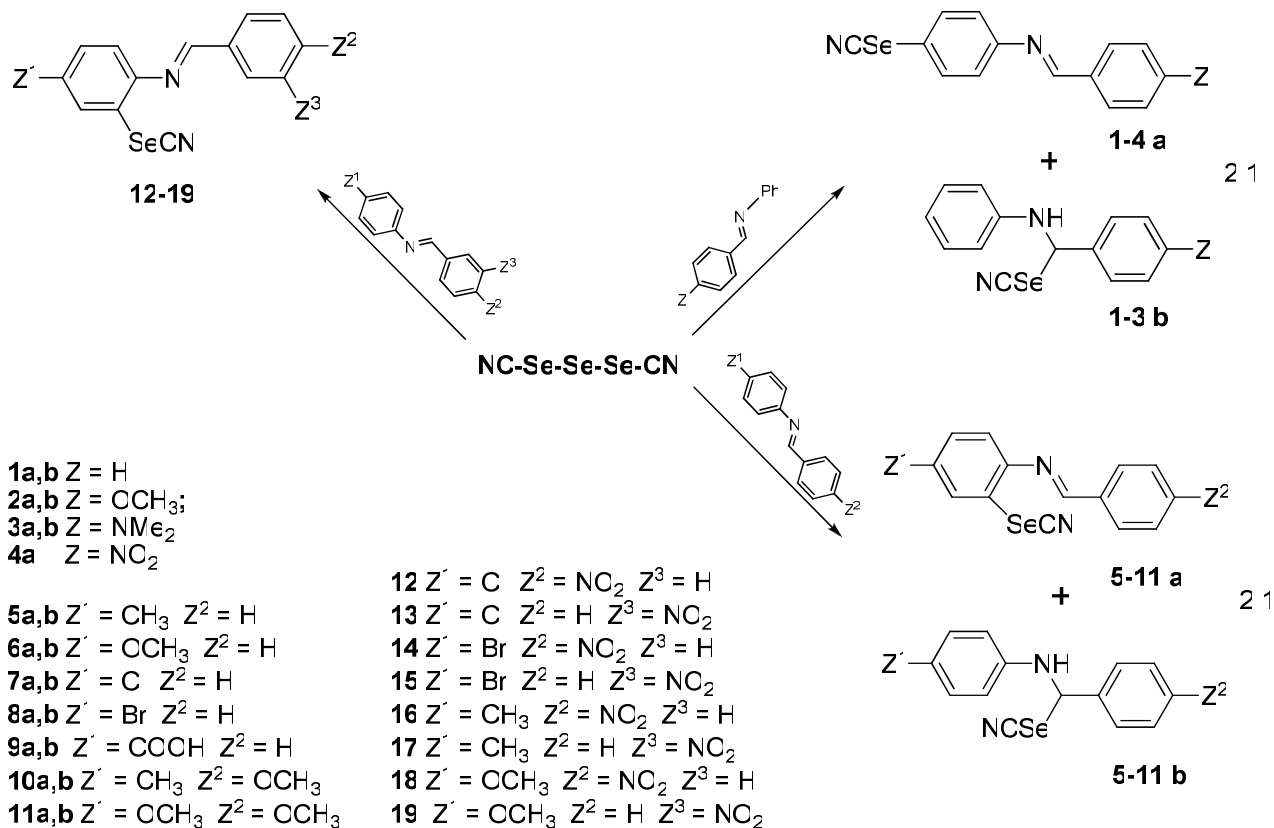
Изучение регионаправленности реакции селеноцианирования оснований Шиффа с различными заместителями под действием триселендицианида

Н.Г. Сидоров, О.С. Леденева

Дальневосточный государственный университет

Электронная почта: nsidorov@chem.dvgu.ru

Изучено влияние различных заместителей на регионаправленность реакции селеноцианирования оснований Шиффа под действием триселендицианида методом *one-pot reaction*¹.



Для оснований Шиффа, не имеющих заместителей в ароматическом ядре анилинового фрагмента, селеноцианирование проходит преимущественно в *para*-положение к атому азота (**1-4a**). В случае, если *para*-положение к атому азота занято, селеноцианирование проходит в свободное *ortho*-положение. Акцепторные заместители существенно затрудняют прохождение реакции.

При отсутствии заместителей или наличии донорных групп в ароматическом ядре бензальдегидного фрагмента реакция идет нерегиоселективно, образуя смеси продуктов моноселеноцианирования по ароматическому ядру анилинового фрагмента и по двойной связи C=N в соотношении 2:1 (**1-3a,b**; **5-11a,b**).

При наличии акцепторных заместителей в ароматическом ядре бензальдегидного фрагмента протекание реакции по двойной связи блокируется, и селеноцианирование проходит по ароматическому ядру анилинового фрагмента (**12-19**).

Структуры полученных продуктов доказаны с помощью ИК-, масс- и ЯМР-спектроскопии.

Конструирование мутантных OmpF поринов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* и отработка условий их экспрессии

О.В. Сидорова, М.П. Исаева, В.А. Хоменко, О.Д. Новикова
Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: olga_ximik@mail.ru

OmpF порин возбудителя псевдотуберкулёза *Yersinia pseudotuberculosis* является бета-баррельным белком, основным структурным элементом которого служит мономер, состоящий из трансмембранных бета-тяжей, соединённых короткими, периплазматическими, и более длинными, «внешними», петлями [1]. Функциональной единицей белка является гомотример, где каждый мономер образует собственную пору в НМ бактерии. Тример является чрезвычайно стабильным и не диссоциирует на мономеры при высоких температурах и в присутствии сильных денатурирующих соединений. В литературе имеется очень мало сведений об участии петель в олигомеризации и стабилизации тримера порина. Поэтому конструирование мутантных форм данного белка с делециями петель позволит уточнить роль аминокислотных остатков в образовании, стабилизации и функционировании тримерной формы поринов разных иерсиний.

Для получения мутантных конструкций, несущих *ompF* ген с делециями петель, была использована система «QuikChange site-directed mutagenesis» (Stratagene, США) с применением TurboTaq полимеразы и мутантных праймеров. В ходе работы были разработаны оптимальные условия получения мутантных конструкций, эффективность составила более 90%.

Оптимизацию условий экспрессии мутантных OmpF поринов *Y. pseudotuberculosis* отрабатывали на конструкции *ompF*, несущей делецию 4-ой петли. Было исследовано влияние следующих параметров культивирования: концентрация индуктора, время индукции и состав питательной среды. В ходе экспериментов не были найдены оптимальные условия экспрессии белка, позволяющие получить его в зрелой форме. Было сделано предположение, что при таких условиях белок экспрессируется в незрелой форме (с сигнальной последовательностью) и накапливается в цитоплазме в нерастворимой форме. Для повышения «растворимости» рекомбинантного белка и доставке его к внутренней мембране были использованы плазмиды, несущие разные наборы шаперонов («Chaperone plasmid set», Takara, Япония). Результаты показали, что мутантный OmpF экспрессировался в зрелой форме только с шаперонами, кодируемыми плазмидами pKJE7 (набор шаперонов: dnaK-dnaJ-grpE), pGro7 (набор шаперонов: groES-groEL) и pGrTf2 (набор шаперонов: groES-groEL-tig).

В дальнейшем планируется более детальное изучение факторов, влияющих на экспрессию мутантных OmpF поринов *Y. pseudotuberculosis* в клетках *E.coli*, а также установление роли отдельных петель в функциональных и иммунобиологических свойствах полученных белков.

Работа поддержана грантом РФФИ №08-08-00823-а «Конструирование и исследование неспецифических порообразующих белков грамотрицательных бактерий с измененными структурно-функциональными свойствами»

1. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol. & Mol.Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 593-656.

Формирование и механические свойства бионанокompозитов хитозана с сапонитом

В. Е. Силантьев¹, Ю. А. Щипунов²

¹Дальневосточный государственный университет

²Институт химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: vovic12@mail.ru

Хитозан считается полисахаридом, который еще не нашел должного применения, хотя обладает способностью формировать материалы с уникальными характеристиками, а, кроме того, он биосовместим и биоразлагаем. Он также проявляет антисептическую, ранозаживляющую и некоторые виды биологической активности, что позволяет использовать материалы на его основе в фармакологии, медицине, биоинженерии и косметике [1]. Одним из существенных недостатков хитозана, ограничивающим его применение, является отсутствие гелеобразующих свойств. Методы, которые предложены к настоящему времени, заключаются в химической модификации или сшивке полисахарида, но они приводят к ухудшению биосовместимости и потере биологической активности.

Настоящее сообщение посвящено рассмотрению нового метода, разработанного в Институте химии ДВО РАН, который позволяет сформировать гидрогели не прибегая к химическим методам. Он основан на регулировании заряжения хитозана медленным подкислением водного раствора [2]. По мере появления положительных зарядов на макромолекулах они вступают во взаимодействия с отрицательно заряженными наноразмерными частицами глины, что приводит к желированию раствора и формированию бионанокompозита. При таком проведении процесса исключается выпадение осадка, материалы получаются монолитными с сохранением всех отмеченных достоинств хитозана. Их механические свойства, которые имеют определяющее значение при применении бионанокompозитов, были изучены с помощью динамической реологии.

Реологические измерения проводились с помощью ротационного реометра компании «Нааке» (Германия). Измерительная ячейка состояла из пластины и конуса или двух пластин, в зазор между которыми помещали исследуемый материал. Измерения проводили в трех основных режимах: варьирования частоты гармонических осцилляций, измерения деформации материала во времени после наложения постоянного сдвигового напряжения и постепенно возрастающего напряжения сдвига. Это позволило охарактеризовать механические свойства исследуемых бионанокompозитов исчерпывающим образом.

Установлено, что постепенное заряжение хитозана в растворе с диспергированными наночастицами глины (сапонита), проводимое *in situ*, приводит к желированию и резкому возрастанию механической прочности. Эффект наблюдается при небольших концентрациях полисахарида, составляющих порядка 0,1 мас.%. В работе детально изучены зависимости механических свойств от содержания как хитозана, так и сапонита, определены оптимальные концентрационные соотношения компонентов для формирования механически прочных материалов.

Исследование морфологии полученных бионанокompозитов проведено с помощью сканирующей электронной микроскопии. Выяснено, что в результате самоорганизации, происходящей в растворе по мере заряжения макромолекул хитозана, образуются наноразмерные фибриллы, формирующие трехмерную сетчатую структуру. Установленная структурная организация объясняет причину желирования растворов и значительной механической прочности бионанокompозитов.

1. M.-T. Yen, J.-H. Yang, J.-L. Mau // Carbohydr. Polym. 2009. V.75. P.15–21.

2. Y.A. Shchipunov, N.A. Ivanova, S.A. Sarin // Mendeleev Commun. 2009. V.19. P. 149-151.

Исследование влияния соевого белка и казеина на липиды сыворотки крови у людей с умеренной гиперлипидемией

Д.В. Склад

Амурская государственная медицинская академия, г. Благовещенск

Электронная почта: borodin@amur.ru

В работе проведено исследование влияния эффективности соевого белка на липиды сыворотки крови у людей с умеренной гиперлипидемией. Для участия в исследовании были отобраны 30 мужчин и женщин в возрасте 32-64 лет, соответствующие следующим критериям: индекс массы тела 22-34 кг/м², общий холестерин сыворотки крови 240-330 мг/дл, ЛПВП-холестерин 40-70 мг/дл, триглицериды 100-280 мг/дл, отсутствие явных признаков заболеваний со стороны эндокринной системы, печени, почек, ЖКТ. Из числа этих людей были сформированы опытная и контрольная группы максимально возможно идентичные по определяемым физическим и биохимическим индексам. Дизайн исследования – пересекающийся. Участники опытной и контрольной групп получали на протяжении 2 месяцев соевый белок и содержащий казеин обезжиренный творог в ежедневной дозе около 30 г в виде кондитерских изделий. Ежедневный прием соевого белка сопровождался снижением содержания общего холестерина на 17 мг/дл (6,5 %) ($p=0,0099$), ЛПНП+ЛПОНП-холестерина на 22 мг/дл (11%) ($p=0,0023$), триглицеридов на 31 мг/дл (18%) ($p=0,022$) и увеличением ЛПВП-холестерина на 5,1 mg/dl (9%) ($p=0,0047$). Не выявлено каких-либо достоверных изменений в крови участников контрольной группы. При сопоставлении влияния соевого белка на сывороточные липиды и глюкозу у мужчин и женщин выявлено статистически достоверное снижение общего холестерина на 17 мг/дл (5,9%, $p=0.033$), ЛПНП+ЛПОНП-холестерина на 29 мг/дл (12,5%, $p=0.014$) и глюкозы на 9,3 мг/дл (10,2%, $p=0,034$) только у женщин. Достоверное увеличение содержания ЛПВП-холестерина на 5 мг/дл (8,3%, $p=0,039$), напротив, было характерно только для мужчин. Вследствие большого варьирования величин содержания триглицеридов в крови участников отмечаемые различия в содержании этих липидов у мужчин и женщин не были статистически достоверными. Делать окончательное заключение об особенностях влияния соевого белка на липиды и глюкозу крови у мужчин и женщин преждевременно поскольку количество участников мужского пола (9 человек) было недостаточно.

Применение метода озонотерапии при лечении гнойных заболеваний мягких тканей

А.А. Сколубович, Н.А. Дружинина
Амурская Государственная Медицинская Академия
Электронная почта: ssemioo@rambler.ru

Современная медицина опирается, в основном, на медикаментозные методы лечения. Такой уклон развития медицины привел к целому ряду негативных последствий для здравоохранения: рост лекарственных аллергий, тяжелых заболеваний и даже смертности на фоне побочных эффектов медикаментозной терапии; злоупотребление антибиотиками; резкое увеличение количества резистентных штаммов микроорганизмов. Озонотерапия – современный немедикаментозный метод лечения, эффективный при широком спектре заболеваний. В его основе лежит применение озонокислородных смесей, озонированной воды, растворов, масел, а так же возможно озонирование крови.

Озон - молекула, состоящая из 3-х атомов кислорода, аллотропная модификацию кислорода, газ с резким характерным запахом, молекулярная масса 48 г/моль, плотность относительно воздуха 1,657 (озон тяжелее воздуха). Он является значительно более сильным окислителем, чем кислород. В связи с этим, озон окисляет многие вещества инертные к кислороду в обычных условиях. Действие озона зависит от его дозы. Озон проникает в ткани и в процессе своего разложения на атомы кислорода, обеспечивает длительный эффект воздействия, что является его преимуществом перед кислородом.

В ходе исследования оценки клинической эффективности методов озонотерапии в комплексном лечении был использован аппарат «УОТА60-01» фирмы «МЕДОЗОН». В качестве лечебных мероприятий были избраны: 1 - эрация открытых гнойных ран озонокислородной смесью в концентрации 60-80 мг/л в фазу воспаления, и 5-10 мг/л в фазу регенерации, экспозиция в течение 20-30 мин.; 2 - орошение раны при перевязке озонированными физиологическим и гипертоническим растворами с концентрацией озона 12 мг/л; 3 - внутривенное введение озонированного 0,9% раствора натрия хлорида в концентрации 2-4 мг/л. Были получены следующие результаты, подтвержденные микробиологически: 1 - озон подавляет рост бактериальной флоры: стафилококков, протей, кишечной палочки, клебсиеллы, грибов, анаэробной флоры; 2 - под его влиянием повышается чувствительность микробов к антибиотикам; 3 - отмечается быстрая бактериальная деконтаминация ран, очищение их поверхности от некротических масс, появление грануляций и краевой эпителизации; 4 - в условиях озонотерапии на 3-4 сутки исчезает болевой синдром; 5 – парентеральное применение озона оказывает выраженное детоксикационное воздействие на организм

Адаптационные возможности мицелиальных грибов к морской среде

Н.Н. Слинкина, Ю.В. Бурцева, М.В. Пивкин

*Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН*Электронная почта: sheflera@bk.ru

Грибы являются одними из наиболее распространенных, но в то же время и наименее изученных организмов на Земле, особенно грибы морских экосистем. Воды Мирового океана обладают рядом специфических и уникальных свойств, с одной стороны являющихся лимитирующими для развития многих живых организмов, с другой – характеризующиеся постоянной температурой и благоприятным световым режимом, а также разнообразными питательными субстратами, приемлемыми для развития мицелиальных грибов. В связи с этим грибы представляют несомненный интерес как организмы, в различной степени толерантные к условиям морской среды. Они заселяют разнообразные субстраты (древесина, водоросли, различные гидробионты и т.д.), но наибольшая плотность грибных пропагул сосредоточена в аквапочвах, микобиота которых представлена в основном факультативными морскими грибами. По нашим данным около 90% их видового разнообразия приходится на анаморфные грибы (Anamorphic fungi), 10% - сумчатые грибы (*Ascomycota*). Подавляющая часть грибов аквапочв – космополиты, широко распространенные и в наземной среде. Чаще всего встречаются виды из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium* и др. Видовой состав и показатели биоразнообразия грибных комплексов варьируют в зависимости от гранулометрического состава аквапочв, солености, содержания органического углерода, углеводов нефти, антропогенной нагрузки, что показано нами на примере грибных комплексов в Японском море и шельфовой зоны острова Сахалин.

Приспособление к условиям среды происходит не только на видовом, но и физиологическом уровне отдельных организмов. Грибы обладают большими адаптационными способностями. Предполагается, что факультативные морские грибы, в отличие от облигатных, имеют несколько иные адаптационные стратегии, которым в настоящее время посвящены немногочисленные работы, например, наличие микоспоринов, образование антимикробных метаболитов, а также изменение состава и уровня активности ряда ферментов.

Изучение выделенных нами из аквапочв и других мест обитания (беспозвоночные, водоросли) штаммов грибов показало, что среда обитания оказывает существенное влияние на состав ферментной системы факультативных морских грибов. Во многих случаях различается и ферментативный состав штаммов одного вида, собранных в различных местах обитания. У исследованных штаммов морских грибов прослеживались некоторые закономерности в продуцировании О-гликозилгидролаз: в грибах аквапочв оказались широко представлены 1,3-β-D-глюканазы, амилазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы; в грибах, выделенных с поверхности водорослей, обнаружены преимущественно β-D-глюкозидазы и β-D-галактозидазы; в грибах-ассоциантах морских беспозвоночных преобладала амилаза.

Таким образом, широкая вариабельность О-гликозилгидролаз грибов представляется биологически целесообразной, т.к. позволяет грибам в зависимости от условий среды секретировать те ферменты, которые в первую очередь необходимы для поддержания их жизнедеятельности.

Работа поддержана грантами РФФИ №08-04-00289 и №09-04-00761, ДВО РАН, Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и госконтрактом федерального агентства по науке и инновациям Российской Федерации 02.518.11.9169.

Создание БАД на основе каррагинанов. иммуномодулирующая и антиоксидантная активности каррагинанов из красных водорослей дальневосточных морей

Е.В. Соколова

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: ika9739@yandex.ru

Сульфатированные полисахариды красных водорослей – каррагинаны – относятся к растворимым пищевым волокнам и внесены в список пищевых и медицинских продуктов. Биологические свойства каррагинанов находятся в тесной связи с их физико-химическими свойствами и структурой, которая отличается большим разнообразием и блочным строением полимерной цепи, что определяется родовой принадлежностью водоросли и условиями ее произрастания. Благодаря полиионной природе каррагинаны способны к многоточечному взаимодействию с поверхностью иммунокомпетентных клеток, что может обеспечивать модуляцию различных звеньев иммунной системы. Каррагинаны широко используются в различных областях пищевой промышленности, в связи с чем особый интерес представляет изучение их антиоксидантного действия.

Изучена иммуномодулирующая активность каррагинанов различных структурных типов, выделенных из красных водорослей семейств Gigartinaceae и Tichocarpaceae: κ - и λ -каррагинаны (*C. armatus*), κ/β - и X-каррагинаны (*T. crinitus*) и κ/λ из *C. pinnulatus*. Показано, что из всех типов каррагинанов наиболее ярко выраженным иммуностимулирующим эффектом обладает λ -каррагинан, что выражается в увеличении внутриклеточной концентрации ионов кальция в лимфоцитах, усилении формирования активных форм кислорода в макрофагах и индукции апоптоза в опухолевых клетках. Все типы каррагинанов, индуцируют синтез иммунокомпетентными клетками таких медиаторов иммунной системы как ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО α . Наибольшей цитокин-индуцирующей активностью в области высоких концентраций обладает κ -каррагинан, а наименьшей – X-каррагинан.

Оценена антиоксидантная активность различных структурных типов каррагинанов по их способности восстанавливать железо(III) в железо(II). Установлено, что наибольшую антиоксидантную активность в этом тесте проявляет λ -каррагинан.

Работа выполнена в рамках программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Фундаментальные науки - медицине” и научной школы акад.Ю.С. Оводова.

Ингибирование экспрессии белков, формирующих транспортный канал ядерных пор, нарушает процесс сборки пор в ядерной оболочке дрожжейА.А. Струнов^{1,2}¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН²Новосибирский государственный университет

В организации ядерных поровых комплексов эукариот (ЯПК), которые обеспечивают транспорт молекул между ядром и цитоплазмой, участвуют тридцать белков – нуклеопоринов. Установлено, что у дрожжей четыре нуклеопорина (Nup53, Nup59, Nup170, Nup157) входят в состав центрального канала поры, а белки Pom152, Pom34 и Ndc1 являются трансмембранными и обеспечивают связь поры с ядерной оболочкой. Недавно было показано, что снижение экспрессии белка Ndc1, тесно взаимодействующего с белками центрального канала поры, блокирует деление клеток дрожжей, а также вызывает нарушение распределения белков транспортного канала в ядерном поровом комплексе. Однако механизм этих процессов и их функциональная значимость для транспорта молекул, и особенно для сборки ядерных пор, до сих пор не установлены. Одним из подходов к изучению этих вопросов может служить электронно-микроскопический анализ организации ЯПК в клетках, мутантных по белкам центрального канала и трансмембранным нуклеопоринам.

Целью данной работы было сравнительное исследование тонкой морфологии ядерных пор в клетках дрожжей несущих мутацию по одному из белков центрального канала ядерной поры - Nup59 или трансмембранному белку Pom34p. Ранее показано, что оба белка способны взаимодействовать с нуклеопорином Ndc1. Для анализа использовались мутантные линии KW2 и KW4, в которых экспрессия белков Nup59 и Pom34p, соответственно, находилась под контролем метионинового промотора. Это позволяло выключать ген, кодирующий изучаемый белок при выращивании мутантных линий на селективной среде, и регистрировать появляющиеся нарушения в организации ядерной поры. Приготовление препаратов дрожжей для электронной микроскопии затруднено наличием толстой клеточной оболочки, через которую не проникает фиксатор, поэтому для фиксации дрожжей часто используют замораживание образцов под высоким давлением. Однако при этом тонкая организация ядерных пор выявляется недостаточно хорошо. Поэтому мы анализировали образцы после частичного удаления оболочки клеток с помощью фермента, либо после фиксации клеток сильным окислителем $KMnO_4$, способным проникать через оболочку дрожжей. Установлено, что оба метода обеспечивают хорошую сохранность поровых комплексов и внутриклеточных мембранных компонентов в 50% дрожжевых клеток. Электронно-микроскопический анализ мутантов KW2 и KW4 дрожжей (полученных в лаборатории *Молекулярной и клеточной биологии Калифорнийского Университета, США*, зав. Др. Karsten Weis) показал, что размер ЯПК в ядерной оболочке обоих мутантов отличается от контроля. Установлено, что средний диаметр ядерной поры у мутанта KW2 составляет 120нм, что в полтора раза выше, чем в контроле, в то время как у мутанта KW4 достоверного увеличения этого параметра пор не обнаружено. Кроме того, количественный анализ показал, что в случае мутации по белку Pom34p увеличивается расстояние между порами, что, возможно связано с уменьшением числа пор в ядерной оболочке. Полученные данные свидетельствуют о том, что оба исследованных белка, расположенных в разных доменах ядерной поры необходимы для целостности функционально активных пор в ядерной оболочке, а также сборки новых пор в дрожжевой клетке.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ и МКБ
Научный руководитель:- к.б.н., в.н.с. Киселева Е.В.

Применение лазерного излучения в лечении гнойных ран и трофических язв

Е. С. Тарасюк

Амурская государственная медицинская академия

Электронная почта: turbovuy@mail.ru

В настоящее время в комплексе лечения гнойных ран и трофических язв широко используется низко интенсивное лазерное воздействие.

Низко интенсивное лазерное излучение оказывает:

- противовоспалительное действие
- усиливает фагоцитоз
- усиливает пролиферацию клеточных элементов соединительной ткани
- в конечном итоге приводит к ускорению заживления ран и трофических язв

В клинике факультетской хирургии в последние годы в лечении гнойных ран и трофических ран внедряются различные виды низкоинтенсивных лазерных аппаратов (ЛА – 2, Кр – Ик, Магик, Милта - Ф, Мулат) с длиной волны 630 до 850 нм с выходной мощностью аппаратов от 5 до 80 мВт в красном и инфракрасном спектрах действия.

Лазерное излучение подводят к раневой поверхности с использованием аппаратов определения мощности и плотности светового потока, площади светового пятна.

Нами проведена сравнительная оценка результатов лечения пациентов с использованием НИЛИ. Основная группа (17 пациентов) у которых на фоне общепринятой консервативной терапии применяли НИЛИ. Контрольную группу составили 25 больных.

Эффективность лечения оценивали по клинической картине с учетом:

- сроков некролиза
- появление грануляций
- начало эпителизации

Средние сроки:

	Основная группа	Контрольная группа
Некролиза	5.1	9.4
Появление грануляций	6.2	10.3
Начало эпителизации	9.0	13.9

Таким образом, использование НИЛИ в лечении пациентов с гнойными ранами и трофическими язвами венозной этиологии позволяет:

- уменьшить сроки некролиза
- ускорить период появления грануляций
- сократить сроки нетрудоспособности
- повысить уровень жизни пациентов

Получение рекомбинантных форм актинопоринов и исследование их гемолитической активности

Е. С. Ткачева, Е. В. Лейченко, М.П. Исаева, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: estkacheva@gmail.com

Рекомбинантные белки являются ценным материалом для изучения структурно-функциональных взаимоотношений макромолекул. С помощью рекомбинантных технологий можно получать большие количества белковой массы без привлечения природных источников, модифицировать первичную структуру белка и получать молекулы с новыми свойствами.

Актинопорины – семейство родственных цитолитических токсинов актиний с молекулярной массой 17-20 кДа, которые проявляют гемолитическую активность в наномолярных концентрациях. Исследования показали, что актинопорины обладают широким спектром биологической активности, например, цитолитической, цитотоксической, кардиостимулирующей, дерматонекротической, антиопухолевой [1-2].

Ранее сотрудниками нашей лаборатории был выделен актинопорин RTX-A из тропической актинии *Heteractis crista* (= *Radianthus macrodactylus*), а также исследованы его свойства. В последнее время наше внимание направлено на получение рекомбинантных форм актинопоринов и изучение их структуры и функций.

Для получения рекомбинантных полипептидов были созданы конструкции гена актинопорина с плазмидным вектором рЕТ41a(+). При скрининге колоний было обнаружено, что нуклеотидные последовательности гена актинопорина, встроенные в плазмидный вектор, имеют некоторые отличия. При сравнении нуклеотидных и выведенных на их основе аминокислотных последовательностей, были обнаружены четыре различные аминокислотные последовательности. В результате экспрессии в бактериальной системе было получено четыре рекомбинантных актинопорина. На рисунке представлены аминокислотные последовательности этих изоформ: rRTX-A70, rRTX-A71, rRTX-A76 и rRTX-A78.

```

1
70 (direct 1) (1) ALAGTIIAGASLTKILDEVLGELGKVSRLIAVGDNESGGSWTALNAYFRSGTTDVILPEFVFNQKALLYSGRKRGGPEATGAVAFAFYMSD
71 (direct 1) (1) ALAGTIIAGASLTKILDEVLGELGKVSRLIAVGDNESGGSWTALNAYFRSGTTDVILPEFVFNQKALLYSGRKRGGPEATGAVAFAFYMS
76 (direct 1) (1) ALAGTIIAGASLTKILDEVLGELGKVSRLIAVGDNESGGSWTALNAYFRSGTTDVILPEFVFNQKALLYSGRKRGGPEATGAVAFAFYMS
78 (direct 1) (1) ALAGTIIAGASLTKILDEVLGELGKVSRLIAVGDNESGGSWTALNAYFRSGTTDVILPEFVFNQKALLYSGRKRGGPEATGAVAFAFYMS
Consensus (1) ALAGTIIAGASLTKILDEVLGELGKVSRLIAVGDNESGGSWTALNAYFRSGTTDVILPEFVFNQKALLYSGRKRGGPEATGAVAFAFYMSNG
101
70 (direct 1) (101) NTLGVMFVSVDYNYSNWWDVKIYSGKRRAQGMYEDMYGNPYRGDNGWHQKNLGYGLKMKGIMTSAGEAILQIKITR
71 (direct 1) (101) HTLGVMFVSVDYNYSNWWDVKIYSGKRRAQGMYEDMYGNPYRGDNGWHQKNLGYGLKMKGIMTSAGEAILQIKITR
76 (direct 1) (101) HTLGVMFVSVDYNYSNWWDVKIYSGKRRAQGMYEDMYGNPYRGDNGWHQKNLGYGLKMKGIMTSAGEAILQIKITR
78 (direct 1) (101) HTLGVMFVSVDYNYSNWWDVKIYSGKRRAQGMYEDMYGNPYRGDNGWHQKNLGYGLKMKGIMTSAGEAILQIKITR
Consensus (101) NTLGVMFVSVDYNYSNWWDVKIYSGKRRAQGMYEDMYGNPYRGDNGWHQKNLGYGLKMKGIMTSAGEAILQIKITR
    
```

При сравнении гемолитической активности полученных рекомбинантных белков было обнаружено, что образцы rRTX-A71 и rRTX-A76 проявляют активность 2×10^4 и 4×10^4 гемолитических единиц соответственно, что сопоставимо с активностью нативного актинопорина ($3,5 \times 10^4$ гемолитических единиц). Активность белков rRTX-A70 и rRTX-A78 была ниже, чем у нативного токсина RTX-A и составила $2,2 \times 10^2$ и 1×10^3 гемолитических единиц соответственно. Очевидно, различие в значениях гемолитической активности связано с аминокислотными заменами, что приводит к изменению заряда в сайтах связывания актинопорина с мембраной.

1. Anderluh G., Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). // *Toxicon*. 2002. V. 40. P. 111-124.

2. Parker M.W., Feil S.C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. // Mol. Biol.* 2005. V. 88. P. 91-142.

Влияние глюкокортикоидов на водовыделительную функцию почек крыс WistarА.В. Тупицына^{1,2}, А.В. Бабина², Н.О. Кабилова¹¹ Институт цитологии и генетики СО РАН² Новосибирский государственный университетЭлектронная почта: aysa@ngs.ru

Поддержание водно-солевого гомеостаза организма – одна из основных функций почек. Согласно концепции А.Г. Гинецинского, изменение состояния и содержания гликозаминогликанов в межклеточном пространстве и в соединительной ткани может оказывать влияние на реабсорбцию воды в почке. Основным компонентом внеклеточного матрикса является гиалуронан (гиалуроновая кислота, ГК) – гликозаминогликан, в высокополимерном состоянии формирующий гель с высоким сопротивлением току жидкости. Известно, что ГК синтезируется на внутренней поверхности плазматической мембраны гиалуронансинтазами 1-3 типа (HAS 1-3), при этом установлено, что HAS2 является наиболее устойчивой и синтезирует продукт наибольшей длины. Ранее на культурах клеток было показано, что в физиологических концентрациях гидрокортизон поддерживает активный синтез и высокие концентрации гиалуронана, в то время как высокие фармакологические дозы замедляют оборот гиалуронана и снижают его концентрацию. Однако данных о влиянии кортикостероидных гормонов на экспрессию генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуронана, в почке нами не обнаружено.

В настоящей работе методом ОТ-ПЦР исследовалось влияние кортизола на активность экспрессии гена гиалуронансинтазы 2 типа (*HAS2*) в различных функциональных зонах почки адреналэктомированных крыс Wistar. С помощью гистохимического анализа (окраска по Хейлу и алциановым синим) проводилась оценка изменения содержания ГК в почке крыс в ответ на введение гормона. Установлено, что внутрибрюшинное введение адреналэктомированным животным физиологической дозы кортизола (1 мкг на 1 г веса) приводит к активации экспрессии *HAS2* в корковой зоне и во внутреннем мозговом веществе почки, в то время как в наружном мозговом веществе содержание мРНК *HAS2* не изменяется. Данные гистохимического анализа препаратов корковой и внутренней мозговой зоны почки согласуются с результатами ОТ-ПЦР и свидетельствуют об увеличении количества гликозаминогликанов в ответ на введение гормона. Введение фармакологической дозы кортизола (5 мкг на 1 г веса) не приводит к существенным изменениям содержания мРНК *HAS2* в корковой зоне почек, в наружном и внутреннем мозговом веществе активность экспрессии *HAS2* достоверно снижается по сравнению с контролем. Одновременно с этим на препаратах коркового и наружного мозгового вещества почки наблюдается уменьшение содержания гликозаминогликанов. В интерстициальном пространстве внутреннего мозгового вещества почки под влиянием высоких доз гормона происходит изменение структуры гиалуронана – на препаратах видны разрыхленные волокна и полости, что может свидетельствовать об активации процессов дегградации ГК под действием кортизола, подтверждение этого предположения требует проведения дальнейших исследований. Сопоставление полученных в работе данных позволяет прийти к заключению, что кортикостероиды способны регулировать процесс синтеза ГК как на уровне экспрессии гена, так и на уровне содержания ГК в интерстиции исследуемых функциональных зон почки. При этом обнаруженный эффект является дозозависимым – физиологические концентрации кортизола приводят к активации экспрессии *HAS2* и увеличению содержания ГК (по сравнению с контрольными адреналэктомированными животными), в то время как фармакологическая доза кортизола подавляет экспрессию гена и выработку гиалуронана в интерстиции почки.

Динамика биохимических показателей в условиях экспериментального исследования лекарственной формы: «Протуб-леме»

К.И. Усов¹, Г.Г. Юшков¹, А.А. Гущина¹, А.С. Гуцин², А.Н. Портяной¹
¹НИИ биофизики, ГОУ Ангарская государственная техническая академия ФА по образованию ²ОАО Фармсинтез
Электронная почта: chemist545@mail.ru

Для оценки доклинического изучения биохимических показателей, лекарственной формы: «Протуб-леме» (лемефлоксацина гидрохлорида 200 мг + изониазида 135 мг + пиразинамида гидрохлорида 325 мг + пиридоксина гидрохлорида 10 мг) были взяты в качестве экспериментально-биологической модели белые нелинейные крысы (самцы, самки). Лемефлоксацин, входящий в состав «Протуб-леме», являющийся одним из основных действующих компонентов, выпускается в виде гидрохлорида и на сегодняшний день является одним из наиболее активных антибактериальных препаратов группы фторхинолонов. В состав препарата наряду с другими активными компонентами входит изониазид, как противотуберкулезный препарат первого ряда.

При однократном внутрижелудочном введении крысам, с помощью металлического зонда с атравматичным наконечником, в дозах: 660 мг/кг (токсичная), 132 мг/кг (промежуточная), 13,2 мг/кг (терапевтическая) «Протуб-леме» (по лемефлоксацину) в виде водной суспензии, контроль вели на 1, 3, 7, 14, 21 сутки. Было обнаружено при токсической дозе повышение активности печеночных ферментов в сыворотке крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ) на 1-е и 3-е сутки $84,9 \div 93,0$ ед/л самцы и $96,7 \div 101,3$ самки ед/л при $P < 0,05$, аспартатаминотрансфераза (АСТ) была аналогична в направлении повышения, наблюдалось повышение количества общего белка на 1-е и 3-е сутки $93,0 \div 95,2$ и $95,4 \div 96,8$ г/л, и общего билирубина 1-е и 14-е сутки $8,3 \div 9,2$ и $8,2 \div 9,3$ ммоль/л. Дозе 132 мг/кг была более свойственна тенденция к аналогичным изменениям. Ни токсическая, ни промежуточная доза в клинической практике не используются, что дополнительно подчеркивает надежный запас от терапевтической дозы. Терапевтическая доза не вызвала существенных биохимических сдвигов показателей. Ксантуреновая кислота, как показатель нарушения метаболизма триптофана, была обнаружена только на 3-е и 7-е сутки в количестве $1,2 \div 2,3$ мкг/мл самцы, $1,0 \div 0,8$ мкг/мл самки.

В «субхроническом» эксперименте внутрижелудочное введение в дозах: 132, 60 и 13,2 мг/кг (по лемефлоксацину) «Протуб - леме» проводили ежедневно в течении трёх месяцев, на фоне динамического контроля, на первый, второй и третий месяц эксперимента. Введение дозы 132 мг/кг через три месяца вызвало отчетливое повышение активности АЛТ $65,1 \div 89,7$ и $68,8 \div 94,6$ ед/л и менее отчетливо АСТ. При дозе 60 мг/кг было тоже обнаружено повышение активности этих ферментов, но выражено в меньшей степени. Через три месяца установлено некоторое снижение уровня мочевины $8,1 \div 7,0$ и $8,2 \div 7,1$ ммоль/л, и глюкозы $5,6 \div 4,6$ и $5,8 \div 4,7$ ммоль/л в сыворотке крови, количество же общего белка незначительно повысилось. Количество билирубина и холестерина в сыворотке крови от контроля существенно не отличалось. Доза 13,2 мг/кг ни по одному из выбранных показателей биохимии крови не вызвала отклонений от контроля. Наличие изониазида в моче крыс контролировали с помощью качественной реакции, которая была положительна во всех пробах. Наличие биохимических сдвигов в активности печеночных ферментов при введении токсической и промежуточной дозы, является признаком белково-жировой дистрофии печени. Общая направленность изменений при однократном и многократном введении оставалась по существу одинаковой. Полученные биохимические сдвиги показателей при введении токсической и промежуточной доз были также подтверждены гистохимическими и морфологическими данными.

Конструирование, клонирование и оптимизация экспрессии мутантной формы OmpN порина *Yersinia pseudotuberculosis*

Н.М. Файзулиной, А.М. Стенкова, В.А. Хоменко, М.П. Исаева
Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: issaeva@gmail.com

Для обеспечения поступления низкомолекулярных питательных веществ и выведения метаболитов бактерии имеют специальные белки - порины. Наиболее детально охарактеризованы три главных неспецифических порина *Escherichia coli*: OmpF, OmpC, PhoE [1]. Однако недостаточно изученными остаются минорные порины, представленные в мембране в небольшом количестве. Ранее нами был клонирован и экспрессирован минорный порин - OmpN *Yersinia pseudotuberculosis*, а также начаты исследования по изучению его структурно-функциональной организации и установлению роли отдельных аминокислотных замен на образование стабильной формы белка. Целью настоящей работы было создание экспрессионной плазмиды *OmpN mut/pET*, несущей мутацию 337R->Q в кодируемой последовательности *ompN* гена бактерии *Y. pseudotuberculosis*, и оптимизация условий ее экспрессии в *E. coli*.

Методами генной инженерии была внесена замена в ген *ompN* с помощью сайт-направленного мутагенеза, используя мутантные праймеры и ПЦР-амплификацию. Для трансформации был выбран штамм *E. coli* – BL21(DE3)-omp8, разработанный специально для гетерологичной экспрессии чужеродных поринов в рЕТ-системах [2]. Результаты эксперимента показали, что при высоком уровне экспрессии белок в большом количестве накапливается в цитоплазме, и лишь небольшая часть транспортируется через внутреннюю мембрану, проходя стадию созревания. С целью увеличения количества зрелой формы белка были изучены следующие параметры культивирования: концентрация индуктора, время индукции, температура инкубации, состав и соотношение компонентов питательной среды. В результате были найдены условия экспрессии, которые позволяли получить зрелый белок в преобладающем количестве: концентрация индуктора составила 0,25 мМ; время действия индуктора – 30 мин.; концентрация глюкозы - 0,4%; температура инкубации - 25⁰С. Для инкубации клеток после удаления индуктора более предпочтительной оказалась «бедная» среда М9. В дальнейшем планируется продолжить работу по оптимизации условий экспрессии данного белка. В частности, проверить влияние таких стрессовых факторов как рН среды, осмолярность, температурный шок и шапероны.

1. Nikaido H. // Microbiol. & Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. P. 593-656.
2. Prilipov A., Prashan S., Phale R., Widner c Jurg P. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 13. P. 3388-3392.

**Локализация доменов повышенной и пониженной плотности генов
в политенных хромосомах *D. melanogaster***

В.А. Хорошко^{1,2}, О.В. Демакова¹, Л.В. Болдырева¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН

²Новосибирский государственный университет

Электронная почта: vicerna@ngs.ru

В политенных хромосомах дрозофилы кроме прицентромерного гетерохроматина (ПГХ), содержащего в основном высоко повторенные последовательности ДНК, имеется около 250 районов так называемого интеркалярного гетерохроматина (ИГХ). Эти районы располагаются в плечах хромосом и имеют много общих свойств с ПГХ, таких как плотная упаковка хроматина, задержка завершения репликации и связывание с белком SUUR. Белок SUUR, связываясь с гетерохроматиновыми районами политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*, вызывает недорепликацию ДНК в этих районах. На препаратах политенных хромосом такая недорепликация приводит к образованию видимых «разломов». У мутантов *SuUR*⁻ районы интеркалярного гетерохроматина становятся полностью политенизированными, и «разломы» в районах ИГХ исчезают. Кроме того, у мутантов *SuUR*⁻ также частично повышается степень политенизации районов прицентромерного гетерохроматина и изменяется его цитологическая структура.

Известно, что распределение генов в эукариотическом геноме неслучайно. В последнее время появляются все больше работ по исследованию закономерностей расположения генов и образования кластеров в геномах. Недавно у *D. melanogaster* были выявлены особенности распределения генов в районах поздней репликации и недорепликации в ИГХ политенных хромосом слюнных желез (Бабенко и др., 2009, Belyakin *et al.*, в печати). Авторы обнаружили, что по краям зоны недорепликации зачастую располагаются зоны повышенной плотности генов, в которых находятся короткие и часто перекрывающиеся гены. В самой зоне недорепликации располагаются длинные гены с большими интронами, перемежающиеся длинными межгенными промежутками. Кроме этого, в зонах недорепликации содержатся очень короткие гены, и значительная их часть представляет собой гены, экспрессирующиеся в семенниках самцов.

Целью данной работы было установить корреляцию между молекулярной и цитологической картами в районах ИГХ. Для этого, используя метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), мы выявили соответствие границ зон недорепликации, зон повышенной и пониженной плотности генов дисковому рисунку политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*.

В работе мы использовали линию *D. melanogaster*, мутантную по гену *SuUR*, и контрольную линию дикого типа *Oregon-R*. Методом ПЦР с геномной ДНК, используя специфические праймеры, мы получили зонды из краев зоны недорепликации, пиков учащения генов во фланках и зонды, ограничивающие зоны повышенной плотности генов. Используя мечение биотином и дигоксигенином, мы провели флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) на препараты политенных хромосом. На данный момент изучен район ИГХ 19E1-4. Оказалось, что зона недорепликации четко укладывается в диск 19E1-4, а границы самой единицы приближаются к 19D району с дистальной стороны и к 19F с проксимальной стороны соответственно.

Дальнейшее исследование будет включать в себя аналогичное картирование для еще 10 районов с последующим анализом данных. Изучение распределения генов в районах ИГХ дает возможность выявлять закономерности в организации гетерохроматиновых районов в геноме *D. melanogaster*.

1. Бабенко В. Н., Похолкова Г. В., Кокоза Е. Б., Андреевкова Н. Г., Белякин С. Н., Беляева Е. С., академик Жимулев И. Ф. // Доклады академии наук, 2009, июль 424, №3, с. 407-410.

Адаптации офиур к аутомии

Н.А. Чарлина, И.Ю. Долматов

Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН

Электронная почта: ncharlina@yandex.ru

Важным явлением для выживания животных является феномен аутомии. Он наблюдается у представителей всех классов иглокожих, но в наибольшей степени аутомия представлена у офиур, которые способны отбрасывать, не только части лучей, но и диск с желудком, бурсами и гонадами. Этот процесс возможен благодаря наличию изменчивой коллагеновой ткани (ИКТ) которая обнаружена только у этих животных. Характерной особенностью ИКТ является способность к необратимому резкому снижению механической прочности лигаментов в специализированных для аутомии участках – что облегчает отделение части тела животного.

Проанализировано строение ИКТ у офиур и значение этой ткани для иглокожих. Получены сравнительные данные по устройству места присоединения диска к лучу у этих животных, что позволило выдвинуть гипотезу о филогенетическом значении происхождения комплекса структур диска, участвующих в аутомии.

Впервые изучены процессы аутомии на ультраструктурном уровне у офиур. Установлено участие гранул юксталигаментных клеток в процессах дестабилизации коллагеновых волокон.

Полученные результаты позволяют понять тонкие механизмы функционирования юксталигаментной системы и ее влияния на процессы аутомии, регенерации и развития некоторых структур этих животных. Наши данные расширяют представление о разнообразии ультраструктурной организации юксталигаментных клеток и их функциональных нагрузок у иглокожих.

Клонирование генов, кодирующих ингибиторы сериновых протеиназ из актинии *Heteractis crispa*

В.Е. Чаусова, И.Н. Гладких, К.В. Гузев, Е.В. Лейченко, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская, М.П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН
Электронная почта: v.chausova@gmail.com

Ингибиторы сериновых протеиназ являются уникальными природными инструментами регуляции активности ферментов, принимающих участие во многих биохимических процессах. Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных выделению и установлению физико-химических свойств ингибиторов протеиназ из актиний, практически ничего не известно о структуре генов, кодирующих данный класс соединений, и природе разнообразия (полиморфизм генов) продуцируемых актиниями изоформ ингибиторов протеиназ [1, 2, 3, 4]. Таким образом, изучение полиморфизма генов ингибиторов, а также кодируемых ими аминокислотных последовательностей представляет научный интерес и служит ключом к пониманию структурно-функциональных особенностей ингибиторов протеиназ из актиний и проявления широкого спектра видов биологической активности.

Ранее в нашей лаборатории были выделены четыре высокоспецифичных ингибитора сериновых протеиназ (InhVJ, JnIV, RmIn I, RmIn II) семейства Кунитца из тропической актинии *Heteractis crispa* (ранее *Radianthus macrodactylus*) [1, 3]. Для двух ингибитора (InhVJ, JnIV) были определены полные аминокислотные последовательности, обладающие высокой степенью гомологии. Частичные аминокислотные последовательности были получены с помощью методики 3'- и 5'-RACE и соответствовали N- (4 последовательности) и C- (11 последовательностей) концевым участкам полипептидов, гомология которых с последовательностью ингибитора InhVJ составила от 80 до 95%. На основании сравнительного анализа полученных последовательностей можно предположить о существовании полиморфизма генов, кодирующих изоформы ингибиторов протеиназ.

Как следует из множественного выравнивания полипептидов (рис.), последовательности F1.3. и F2.2. имеют такие же остатки в реактивном сайте (обозначен #), как и в БПТИ. В отличие от F1.3. полипептида, у F2.2. в 16 положении вместо Arg→Gly. Последовательность полипептида F2.5. отличается от ингибитора ваниллоидного рецептора Aphc1 [2] лишь одной заменой в положении 31 (Val→Pro). Уникальные последовательности ингибиторов протеиназ (F1.3., F2.2., F2.5.) представляющие не только теоретический, но и практический интерес (рис.), были клонированы в экспрессионный вектор pET32b(+) для получения рекомбинантных полипептидов.

```

#####
1
Aphc1 -GSI#CLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETCKCTPFFIYGGCEGNGNPFETLRA#CRAICRA-
F2.5. -GSI#CLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETCKCTPFFIYGGCEGNGNPFETLRA#CRAICRA-
Ing VJ -GSI#CLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETCKCTPFFIYGGCEGNGNPFETLHACRAICRA-
Ing-IV -GSI#CLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETCKCTPFFIYGGCEGNSYVDEKLHACRAICRA-
F1.3. -GSI#CLEPKVVGPCKARIRRFYFDSETCECKE#FFIYGGCKGNKNPFETLHCCRAICRA-
F2.2. -GSI#CLEPKVVGPCKAGIRRFYFDSETCKCTPFFIYGGCKGNKNPFETLHACRAICRA-
BPTI RPDF#CLEPKVYTPCKARIRRFYNAKASL#QTFIYGGCKAKRNNEKSAED#MRT#CGGA

```

Рис. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей ингибиторов протеиназ и полученных полипептидов. Консервативные участки окрашены серым цветом, а идентичные – черным. BPTI: ингибитор протеиназ из поджелудочной железы быка *B. taurus*, Aphc1 - ингибитор TRPV1 канала (ваниллоидный рецептор) из актинии *Heteractis crispa*.

1. Зыкова Т., Винокуров Л., Маркова Л., Козловская Э., Еляков Г. // Биооргани. химия. 1985. V. 11. P. 293-301.
2. Andreev Y., Kozlov S., Koshelev S., Ivanova E., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E., Grishin E. // J.Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 23914-23921.
3. Сокогун И., Лейченко Е., Ваколина Т., Еськов А., Ильина А., Монастырская М., Козловская Э. // Биооргани. химия. 2007. V. 33. P. 448-455.
4. Ishida M., Minagawa S., Miyauchi K., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. // Fish Sci. 1997. V. 63. P. 794-798.

Определение первичной аминокислотной последовательности маннан-связывающих лектинов морского ежа *Strongylocentrotus nudus*

Е.В.Шамшурина¹, С.Н. Ковальчук², М.Г. Елисейкина¹, А.А. Булгаков

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН

²Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН

Электронная почта: eshamshurina@rambler.ru

Углевод-распознающие белки – лектины играют важную роль в защитной системе иглокожих. Ранее из целомической жидкости морского ежа *Strongylocentrotus nudus* нами был выделен новый лектин и охарактеризованы его основные физико-химические свойства и углеводная специфичность. На основании полученных данных, этот лектин был отнесен к МСЛ С-лектинам. Однако, для того чтобы наиболее точно на основании современных принципов классифицировать данный лектин необходимо установить его первичную аминокислотную последовательность. Исходя из этих данных можно судить о структурных особенностях молекулы лектина – в частности о пространственной организации участков, ответственных за взаимодействие с углеводами, которые позволят отнести его к определенной группе углевод-распознающих белков, а также установить степень его гомологии с лектинами других групп животных. В связи с этим целью данного исследования было с помощью методов молекулярного клонирования установить первичную аминокислотную последовательность маннан-связывающих лектинов *Strongylocentrotus nudus*.

В результате клонирования кДНК были получены 3 изоформы маннан-связывающих лектинов *Strongylocentrotus nudus*. Причем все 3 формы обладали высокой степенью гомологии и идентичности по отношению друг к другу (больше 65%). Исходя из данных о первичной структуре молекул установлено, что длина зрелых изоформ белков составляет 147, 148, 144 аминокислотных остатка, а молекулярная масса лежит в районе 17 кДа. С помощью компьютерной программы определена вероятная вторичная структура лектинов. Показано, что они являются β -структурированными белками, и состоят из 8 β -тяжей и двух α -спиралей, которые образуют один углевод- распознающий домен.

Сравнение первичной структуры МСЛ *Strongylocentrotus nudus* с первичной структурой других МСЛ показало, что они имеют высокую степень гомологии к лектинам *Strongylocentrotus purpuratus* (более 70%) и манноз-связывающим лектином пятнистого палтуса (50%). Гомология с маннан- связывающими лектинами позвоночных животных и иглокожих – голотурий *Apostichopus japonicus* и *Cucumaria echinata*, оказалась значительно ниже и составила около 20%. Однако, стоит отметить что даже при низкой степени гомологии молекул консервативным остается участкок ответственный за связывание с лигандом – в состав которого входят 3 аминокислоты – глутаминовая кислота, пролин, аспаргин, а так же положение остатков глицина и цистеина, играющих важную роль в формировании третичной структуры углевод распознающего домена.

Таким образом, маннан-связывающие лектины представлены у *Strongylocentrotus nudus* как минимум тремя различными изоформами, которые обладают высокой степенью гомологии и содержат по одному углевод распознающему домену, состоящему из 2 α – спиральных участка и 8 β – тяжей. Степень гомологии маннан-связывающих лектинов *Strongylocentrotus nudus* и других групп животных высока в участке отвечающего за связывание с лигандом– в состав которого входят Glu-Pro-Asn, а так же консервативным является положение остатков глицина и цистеина

Влияние токсичных металлов (Pb, Cd) на микроскопические грибы

Л.П. Шумилова, Н.Г. Куимова

Институт геологии и природопользования ДВО РАН

Электронная почта: Shumilova.85@mail.ru

К основным источникам загрязнения в городе относится автомобильный транспорт. Численность автомобилей на душу населения стремительно возрастает, что приводит к ухудшению экологического состояния городских экосистем. С выхлопными газами в окружающую среду поступает значительное количество тяжелых металлов, среди которых преобладают Pb, Cd. Цель исследований – изучение влияния свинца и кадмия на физиологические функции микромицетов – рост, спороношение, фитотоксичность.

Объект исследования – *Penicillium* ПП18, наиболее распространенный в городских почвах. Посев осуществляли в жидкую среду Чапека по 0,1 мл суспензии, содержащей 10^6 спор. Концентрации металлов в растворах составили: Pb – 50; 100; 150; 300; 1500; 3000; 5000 мг/л; Cd – 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200 мг/л. Фитотоксичность метаболитов оценивали по выживаемости и числу нормально развивающихся проростков тест-растения редиса.

В ходе эксперимента установлено, что Pb в концентрации 50 мг/л проявил стимулирующее действие на рост мицелия, отмечен прирост биомассы относительно контрольного варианта. При повышении концентрации металла до 100 мг/л включались защитные реакции, характерные для грибов: выделение большого количества экзополисахаридов и пигментов, активное спорообразование, группировка мицелия в тяжи. Однако в интервале 100-300 мг/л наблюдали постепенное угнетение роста, вес сухой биомассы значительно уменьшился. Концентрации металла 1500, 3000 мг/л вызывали нарушение всех защитных механизмов клеток, происходила активная сорбция свинца на поверхности клеток грибного мицелия и во внутриклеточном пространстве. Концентрация Pb 5000 мг/л явилась летальной для микромицета. Исходный штамм *Penicillium* ПП18 обладал высокой фитотоксичностью. После обработки семян его метаболитами угнетение проростков составляло более 70%. Установлено влияние свинца на токсикогенность микромицета. Присутствие в среде Pb в концентрациях от 50 до 300 мг/л приводило к уменьшению фитотоксичности биомассы, хотя угнетение тест-растения оставалось еще достаточно высоким – 40-50%. Концентрация 300 мг/л явилась пороговой, при которой подавлялся рост биомассы и, соответственно, сокращалось выделение токсичных метаболитов. При концентрациях Pb 1500, 3000 мг/л подавление роста тест-растений обусловлено токсическим действием самого металла на семена и проростки.

Изучение влияния Cd на биомассу показало, что концентрации металла 1-10 мг/л стимулировали рост грибного мицелия, увеличение биомассы по сравнению с контролем происходило в 3 раза. В отличие от свинца кадмий практически полностью подавлял спорообразование, отмечено легкое пигментирование. При концентрациях 50-100 мг/л наблюдали угнетение роста мицелия. Концентрация 200 мг/л явилась летальной для микромицета. Повышение концентрации Cd приводило к постепенному увеличению фитотоксичности пеницилла, метаболиты которого практически полностью подавляли рост и развитие тест-растений. Установлено, что Cd накапливается в тканях гриба в 4,5 раза меньше, чем свинец. Таким образом, установлены разные концентрации токсичных металлов, при которых наблюдались общие закономерности в ответных реакциях микроскопических грибов на воздействие. Небольшие концентрации стимулируют рост биомассы, мобилизует все защитные свойства организма, однако повышение содержания металлов в среде приводит в дальнейшем к угнетению жизненных функций и, наконец, по достижении критической (летальной) концентрации рост мицелия полностью подавляется. Наиболее токсичным является Cd, который практически полностью подавляет спорообразование и увеличивает фитотоксичность грибов в присутствии даже небольших концентраций металла.

Исследование механизмов стрессорной гипофагии у мышей с мутацией A^y

Е.И. Южик¹, Е.В. Куликова², А.Ю. Шевченко¹, Т.В. Яковлева¹, Н.М. Бажан¹

¹Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН

²Новосибирский государственный университет

Электронная почта: infuturo@mail.ru

Мутация *yellow* в локусе *Agouti* (A^y) у мышей приводит к гиперфагии, развитию меланокортинового ожирения и диабета 2 типа. Ранее было показано, что легкий эмоциональный стресс, который не вызывал каких-либо изменений в метаболизме у мышей с нормальной функцией меланокортиновой системы, приводил к временной гипофагии и потере веса тела у мышей с мутацией A^y (A^y/a -мыши). Неизвестно какие механизмы обуславливают проявление стрессорной гипофагии у A^y/a -мышей.

В регуляции аппетита важную роль играют периферические факторы (глюкоза, кортикостерон) и нейропептиды гипоталамуса: орексигенные (агутиподобный белок, нейропептид Y) и анорексигенные (кортикотропин-релизинг фактор (КРФ), урокортины, которые реализуют свое действие через гипоталамические рецепторы КРФР2). Гипофагия может быть вызвана высокими концентрациями глюкозы, кортикостерона в крови, снижением экспрессии агутиподобного белка, нейропептида Y, а также усилением сигнала, поступающего от КРФ и родственных пептидов, к рецепторам КРФР2 в гипоталамусе.

Цель работы: оценить вклад орексигенных, анорексигенных нейропептидов гипоталамуса и кортикостерона, глюкозы крови в развитие стрессорной гипофагии у A^y/a -мышей.

Эксперименты проводили на 14-недельных самцах мышей линии C57Bl/6J двух генотипов: A^y/a (с развитым ожирением) и a/a (без ожирения). В качестве эмоционального стресса применяли 1-часовую рестрикцию. Уровни глюкозы и кортикостерона в крови измеряли до стресса, через 1 и 3 часа после стресса. Экспрессию мРНК агутиподобного белка, нейропептида Y и КРФР2 оценивали методом ОТ-ПЦР до стресса, через 1 и 3 часа после стресса.

Вес тела у A^y/a -мышей в 1,25 раза больше, чем у a/a -мышей ($31,0 \pm 1,5$ г и $25,1 \pm 0,6$ г соответственно, $p < 0,01$). У A^y/a -мышей относительно a/a -мышей повышено суточное потребление пищи ($5,1 \pm 0,1$ г и $4,3 \pm 0,1$ г соответственно, $p < 0,001$). После стрессорного воздействия суточное потребление пищи у A^y/a -мышей снизилось до уровня a/a -мышей.

Периферические показатели стрессорного ответа были одинаковыми у животных обоих генотипов. Уровень глюкозы, а также базальный и стрессорный уровни кортикостерона в крови не различались у A^y/a - и a/a -мышей ни в одной из измеренных точек.

До стресса уровни экспрессии мРНК агутиподобного белка, нейропептида Y и КРФР2 не различались у A^y/a - и a/a -мышей. Уровень экспрессии мРНК КРФР2 у A^y/a -мышей через 1 час после стресса повышен относительно a/a -мышей ($0,272 \pm 0,044$ у.е. и $0,145 \pm 0,051$ у.е. соответственно, $p < 0,01$), а через 3 часа после стресса снижается до нормы. Уровень экспрессии мРНК агутиподобного белка у A^y/a -мышей через 3 часа после стресса снижен относительно a/a -мышей ($0,078 \pm 0,012$ у.е. и $0,122 \pm 0,012$ у.е. соответственно, $p < 0,05$).

Таким образом, периферические показатели крови в ответ на 1-часовую рестрикцию не отличались у животных обоих генотипов, но, в отличие от a/a -мышей, у A^y/a -мышей было снижено суточное потребление пищи относительно контроля. Кратковременное повышение экспрессии мРНК КРФР2 у A^y/a -мышей может усиливать подавляющий аппетит сигнал от урокортинов и КРФ, концентрация которого резко возрастает под действием стресса, а снижение экспрессии мРНК агутиподобного белка через 3 часа после стресса может вносить вклад в дальнейшее подавление аппетита.

СОДЕРЖАНИЕ

Агеенко Н.В., Борисова К.Л., Куриленко В.В. Синтез и оценка антимикробных свойств хиноидных соединений ряда бензимидазо[2,1-j]хинолина	3
Андреев О.В., Бильданова Е.Р., Волкова Е.И., Демаков С.А., Семешин В.Ф., Жимулев И.Ф. Роль последовательности ДНК длиной 246 пар оснований из района 3С6/С7 <i>D. melanogaster</i> в формировании междиска	4
Бахаев Д.В., Стенкова А.М., Иванова Ю.В., Просекова Е.В., Исаева М.П. Оптимизация метода ПЦР- ПДРФ для идентификации мутаций в гене IL – 13 при аллергических заболеваниях детей Приморского края	5
Белослюдцева В.Н., Исаев Н.П., Дзюба С.А. Влияние холестерина на подвижность спин-меченых липидов в модельных биологических мембранах	6
Белоциценко Е.С., Набивайло Ю.В., Яковлева И.М. Дневная динамика окислительных процессов и активности антиоксидантных ферментов у морских красных водорослей Японского моря	7
Вехова Е.Е. Особенности тонкого строения биссуса трех видов митилид (Mollusca: Bivalvia) в связи с прикрепленным образом жизни в разных биотопах	8
Винникова В. В., Дроздов А. Л. Особенности ультраструктурного строения игл морских ежей семейства Strongylocentrotidae	9
Витязев Ф.В., Шашков А.С. Сульфатирование бергенана, пектина бадана толстолистного <i>Bergenia crassifolia</i>	10
Вищук О.С., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н. Противоопухолевая активность фукоиданов Дальневосточных бурых водорослей	11
Газетдинов М.В., Андреева А.И. Оценка экологического состояния почв г. Владивостока по содержанию токсических элементов	12
Герbst А.Г., Грачев А.А., Шашков А.С., Нифантьев Н.Э. Современные методы теоретического конформационного исследования олиго- и полисахаридов	13
Вакорина Т.И., Гладких И.Н., Монастырская М.М., Козловская Э.П. Конформационная стабильность и взаимодействие с протеиназами ингибитора сериновых протеиназ InhVJ из актинии <i>Heteractis crispa</i>	14
Гончарова А.А., Беркаева М.Б., Демаков С.А. Изучение механизма образования междисков политенных хромосом слюнных желез <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Грачев А.А., Герbst А.Г., Генинг М.Л., Титов Д.В., Цветков Ю.Е., Шашков А.С., Нифантьев Н.Э. Конформационное исследование линейных и циклических β -(1 \rightarrow 6)-олигоглюкозаминов, структурно родственных внеклеточному полисахариду бактерии <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Гришин Д.В., Никитин А.В., Бирюков В.В. Создание новой рекомбинантной белковой конструкции для ферментативного гидролиза бета-галактозидов	17
Грищенко О.В., Киселев К.В., Чернодод, Веселова М.В., Булгаков В.П. Динамика роста и биосинтеза полифенолов в <i>rolB</i> -трансгенной культуре Маакии амурской <i>Maackia amurensis</i>	18- 19
Демина Е.А., Тищенко Л.Я., Шестак О.П., Лихацкая Г.Н., Трифионов Е.В., Анисимов М.М. К вопросу о механизме рострегулирующего действия циклопентановых β, β' -трикетонов	20
Добржанская А.В., Матусовская Г.Г., Матусовский О.С., Реваковская А.Г., Шелудько Н.С. Выделение, идентификация и свойства кальпонин-подобного белка запирательной мышцы мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>	21
Дроздов К.А. Исследование тяжелой ЧМТ у крыс методами МРТ и ЯМР	22
Дышловой С.А., Федоров С.Н., Шубина Л.К., Калиновский А.И., Савина А.С., Стоник В.А. Ааптамины – противораковые вещества из морской губки <i>Aaptos sp.</i>	23
Заболотная А.М., Фаттахова А.Е., Реутов В.А. Разработка технологии извлечения окрашивающих и биологически активных веществ из шелухи гречихи	24

<u>Зайцева О.О., Костерин О.Э., Богданова В.С.</u> Анализ филогенетических отношений культурных и диких представителей рода горох (<i>Pisum L.</i>) на основании нуклеотидных последовательностей генов гистона H1	25
<u>Зверев А. С., Сержанова Н.С., Красавина Н. П.</u> Влияние дигидрохверцетина на морфофункциональное состояние почки при экспериментальной гипергликемии	26
<u>Илинский Ю.Ю., Быков Р.А., Цидулко А.Ю., Захаров И.К.</u> Симбиотические системы Artropoda-Wolbachia	27
<u>Иляскин А.В., Соленов Е.И., Батурина Г.С., Каткова Л.Е.</u> Исследование механизмов регуляции объема главных клеток эпителия собирательных трубок почки	28
<u>Исаева Г.А., Дубровина А.С., Киселев К.В.</u> Получение полных нуклеотидных последовательностей генов <i>STS</i> из <i>Vitis amurensis</i> , кодирующих белок стильбен синтаз	29
<u>Искусных И.Ю., Попова Т.Н.</u> Оценка интенсивности свободнорадикальных процессов в печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией методом индуцированной биохемилюминесценции	30
<u>Искусных И.Ю., Попова Т.Н., Цветикова Л.Н., Мушарова О.С., Чиховская С.С.</u> Фрагментация ДНК в печени крыс в норме, при хронической алкогольной интоксикации и действии мелатонина на фоне патологии	31
<u>Каменев Д.Г., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н.</u> Экспрессия гена силикатеина морской губки <i>Latrunculia oparinae</i> , слитого с зеленым флуоресцентным белком в трансгенных клеточных культурах табака	32
<u>Каретин Ю.А.</u> Численный анализ морфологии прикрепленных <i>in vitro</i> гемоцитов морских беспозвоночных	33
<u>Кирикович С.С., Левитес Е.В.</u> Влияние эпимутагена Тритона X-100 на морфо-физиологические признаки у сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris L.</i>)	34
<u>Киселев К.В.</u> Стабильность наследования и экспрессия генов <i>rolC</i> и <i>nptII</i> в 15-летних клеточных культурах женьшеня <i>Panax ginseng</i>	35
<u>Конькова Д.Ю.</u> Медикаментозное лечение опухолей гипофиза	36
<u>Короткевич Е.Ю.</u> Морфометрический анализ структурных параметров стабильных гибридов, полученных слиянием эмбриональных стволовых и дифференцированных клеток	37
<u>Коротких А.В., Памирский И.Э.</u> Определение гомологии ингибиторов протеаз методами биоинформатики	38
<u>Кравченко А.О., Яковлева И.М., Барабанова А.О.</u> Сезонная динамика содержания пигментов и полисахаридов красной водоросли <i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i> (Harv.) Masuda. (Rhodophyta, Phyllophoraceae)	39
<u>Кулешов А.В., Баталова Т.А.</u> Противовоспалительная активность нового синтетического соединения β -циклодекстрина и ацетилсалициловой кислоты	40
<u>Кулик Л.В., Пивцов А.А., Богачев А.В.</u> Изучение флавиновых радикалов в анионной форме в Na^+ -транслоцирующей NADH:хинон оксидоредуктазе методами импульсного ЭПР	41
<u>Ляхова Е.Г., Колесникова С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А.</u> Вторичные метаболиты вьетнамского голожаберного моллюска <i>Phyllidiella pustulosa</i>	42
<u>Мазейка А.Н., Костецкий Э.Я., Веланский П.В., Воробьева Н.С., Портнягина О.Ю.</u> Разработка липид-сапонинового носителя субъединичных антигенов	43
<u>Мартыяс Е.А., Анисимов М.М., Герасименко Н.И.</u> Противомикробная активность экстрактов из бурых водорослей	44
<u>Марушенко И.Ю.</u> Конституциональные особенности детей с бронхиальной астмой	45
<u>Менчинская Е.С., Аминин Д.Л.</u> Взаимодействие тритерпеновых гликозидов голотурий и их комплексов с холестерином со спленоцитами мыши	46
<u>Мишаков И.В., Веремейчик Г.Н., Шкрыль Ю.Н.</u> Экспрессия гена кальций-зависимой протеинкиназы <i>AtCPK1</i> активирует биосинтез антрахинонов в трансгенных	47

культурах марены сердцелистной	
Мурсалимов С.Р. Поведение клеточных органелл при цитомиксисе	48
Нистратова М.В., Машгальер Д.В., Синебрюхов С.Л., Егоркин В.С., Гнеденков С.В. Защитные покрытия на сплавах магния, полученные с применением наноматериалов	49
Овчинникова О.Г., Кочарова Н.А., Пархомчук А.А., Кондакова А.Н., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Рожальски А. Прогресс в структурных исследованиях липополисахаридов бактерий рода <i>Providencia</i>	50
Падерин Н.М. Влияние биологически активных добавок, содержащих пектины, на воспалительный статус	51
Памирский И.Э., Штарберг М.А., Бородин Е.А. Компьютерное определение гомологии апротинина и ингибитора соевого трипсина	52
Панкова М.Е., Кокоулин М.С., Сахаров Д.А., Штода Ю.П., Чикаловец И.В. Изучение перекрестной реактивности лектина мидии <i>Crenomytilus grayanus</i> с белками лимфы и мантии двустворчатых моллюсков	53
Пелагеев Д.Н., Ануфриев В.Ф. Синтез аналога бикаверина (6, 11-дигидрокси-8,9-диметил-4-метоксибензо[b]ксантен-7,10,12-триона) – метаболита некоторых грибов родов <i>Fusarium, Gibberella u Mycogone</i>	54
Пестрикова Т.Л., Невзорова В.А., Чикаловец И.В., Лукьянов П.А., Голотина О.В. Содержание ФНО- α и его растворимых рецепторов в сыворотке крови пациентов с циррозом печени и его сочетании с ХОБЛ	55
Пискун М.С., Сергиенко А.В., Шарапов О.Ю. Хирургическая и вариантная анатомия лицевого нерва человека	56
Пислягин Е.А., Аминин Д.Л. Взаимодействие тритерпенового гликозида кукумариозида A_2-2 с иммунокомпетентными клетками	57
Полоник Н.С. Новый путь синтеза полигидрокси-1,4-нафтохинонов – биологически активных пигментов морских ежей	58
Полякова Ю.О., Шимко В.В. Комплексное лечение синдрома диабетической стопы	59
Посух О.В., Горчаков А.А., Алексеенко А.А., Юрлова А.А. Определение компонентов комплекса белка SUUR <i>Drosophila melanogaster</i>	60
Розанов А.С., Гунбин К.В., Пельтек С.Е. Распространения гена Ксилоизомеразы в пространстве видов бактерий	61
Роцкая У.Н., Рогозин И.Б., Васюнина Е.А., Колосова Н.Г., Малярчук Б.А., Невинский Г.А., Сеницина О.И. Анализ соматических мутационных спектров в митохондриальной ДНК крыс линии Wistar	62
Сабуцкий Ю.Е., Стоян А.В., Барабанова А.О. Фикобилипротеины- пигменты красных водорослей Японского моря	63
Сарин С.А., Щипунов Ю.А. Изучение зависимости механических свойств от морфологии наноструктурированных гидрогелей хитозана с ксантаном	64
Сейткалиева А.В., Мензорова Н.И., Рассказов В.А. Использование трех ферментативных тест-систем для мониторинга экологического состояния бухты Троицы (Японское море)	65
Сидоров Н.Г., Леденева О.С. Изучение регионаправленности реакции селеноцианирования оснований Шиффа с различными заместителями под действием триселендицианида	66
Сидорова О.В., Исаева М.П., Хоменко В.А., Новикова О.Д. Конструирование мутантных OmpF поринов наружной мембраны <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> и отработка условий их экспрессии	67
Силантьев В. Е., Щипунов Ю. А. Формирование и механические свойства бионанокompозитов хитозана с сапонитом	68
Скляр Д.В. Исследование влияния соевого белка и казеина на липиды сыворотки	69

крови у людей с умеренной гиперлипидемией	
Сколубович А.А., Дружинина Н.А. Применение метода озонотерапии при лечении гнойных заболеваний мягких тканей	70
Слинкина Н.Н., Бурцева Ю.В., Пивкин М.В. Адаптационные возможности мицелиальных грибов к морской среде	71
Соколова Е.В., Создание БАД на основе каррагинанов. иммуномодулирующая и антиоксидантная активности каррагинанов из красных водорослей дальневосточных морей	72
А.А. Струнов Ингибирование экспрессии белков, формирующих транспортный канал ядерных пор, нарушает процесс сборки пор в ядерной оболочке дрожжей	73
Тарасюк Е. С. Применение лазерного излучения в лечении гнойных ран и трофических язв	74
Ткачева Е. С., Лейченко Е. В., Исаева М.П., Монастырняя М.М., Козловская Э.П. Получение рекомбинантных форм актинопоринов и исследование их гемолитической активности	75
Тупицына А.В., Бабина А.В., Кабилова Н.О. Влияние глюкокортикоидов на водовыделительную функцию почек крыс Wistar	76
Усов К.И., Юшков Г.Г., Гущина А.А., Гущин А.С., Портяной А.Н. Динамика биохимических показателей в условиях экспериментального исследования лекарственной формы: «Протуб-леме»	77
Файзулиной Н.М., Стенкова А.М., Хоменко В.А., Исаева М.П. Конструирование, клонирование и оптимизация экспрессии мутантной формы OmpN порина <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	78
Хорошко В.А., Демакова О.В., Болдырева Л.В. Локализация доменов повышенной и пониженной плотности генов в политенных хромосомах <i>D. melanogaster</i>	79
Чарлина Н.А., Долматов И.Ю. Адаптации офиур к аутомии	80
Чаусова В.Е., Гладких И.Н, Гузев К.В., Лейченко Е.В., Монастырняя М.М., Козловская Э.П., Исаева М.П. Клонирование генов, кодирующих ингибиторы сериновых протеиназ из актинии <i>Heteractis crispa</i>	81
Шамшурина Е.В., Ковальчук С.Н., Елисейкина М.Г., Булгаков А.А. Определение первичной аминокислотной последовательности маннан-связывающих лектинов морского ежа <i>Strongylocentrotus nudus</i>	82
Шумилова Л.П., Куимова Н.Г. Влияние токсичных металлов (Pb, Cd) на микроскопические грибы	83
Южик Е.И., Куликова Е.В., Шевченко А.Ю., Яковлева Т.В., Бажан Н.М. Исследование механизмов стрессорной гипофагии у мышей с мутацией A^y	84

Научное издание

**XII Всероссийская молодежная
школа-конференция
по актуальным проблемам химии и биологии
МЭС ТИБОХ, Владивосток, 7-14 сентября**

Сборник трудов

Печатается с оригиналов авторов

Ответственный за выпуск Ю.В. Бурцева

Отпечатано с оригинал-макета,
подготовленного в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН,
минуя редподготовку в «Дальнауке»

Подписано к печати 18.05.2009 г.
Печать офсетная. Формат 60×84¹/₈
Бумага офсетная.
Усл. п. л.10.-изд. л. 0000. Тираж 100 экз. Заказ 00

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство “Дальнаука” ДВО РАН»
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7