

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**ТЕЗИСЫ
КОНКУРСА-КОНФЕРЕНЦИИ
МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И АСПИРАНТОВ**

12 марта 2015 г.

Красноярск

ПРОГРАММА
НАУЧНОЙ СЕССИИ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ И АСПИРАНТОВ
ИБФ СО РАН 2015 ГОДА

Открытие конкурса-конференции 12 марта (четверг), ауд. 1-12 в 10:00

Вступительное слово:

Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., проф. Татьяна Григорьевна Волова

Доклады молодых учёных и аспирантов (10 мин. доклад + 5 мин. вопросы):

1	Шершнева Анна Михайловна Исследование электрокинетического потенциала микроносителей на основе резорбируемых полимеров	10⁰⁵ – 10²⁰
2	Киселев Евгений Геннадьевич Опытное производство полигидроксиалканоатов	10²⁰ – 10³⁵
3	Шумилова Анна Алексеевна Остеогенный потенциал полимерных пористых матриц из ПГА для регенерации костного дефекта черепа крысы	10³⁵ – 10⁵⁰
4	Сырвачева Дарья Анатольевна Микробиологический синтез и свойства новых типов многокомпонентных полигидроксиалканоатов	10⁵⁰ – 11⁰⁵
5	Зыков Владимир Викторович Реконструкция палеоклимата озера Ширы по биомаркерам его донных отложений	11⁰⁵ – 11²⁰
6	Ронжин Никита Олегович Детонационные наноалмазы в создании многоразовой системы определения мочевины	11²⁰ – 11³⁵
7	Башмакова Евгения Евгеньевна Выявление однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с риском развития ряда патологий, билюминесцентным анализом	11³⁵ – 11⁵⁰
8	Ларионова Марина Дмитриевна Новая 16,5 кДа-изоформа люциферазы из <i>Metridia longa</i> : получение и характеристика	11⁵⁰ – 12⁰⁵

Подведение итогов конференции экспертной комиссией

Заключительное слово: Председатель конкурсной комиссии, д.б.н., проф. Т.Г. Волова

Исследование электрокинетического потенциала микроносителей на основе резорбируемых полимеров

А.М. Шершнева¹, науч. рук. д.б.н. Е.И. Шишацкая^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет

2 – Институт биофизики СО РАН

Одной из перспективных областей развития современной биотехнологии и фармакологии являются разработка систем доставки лекарственных препаратов в виде микро- и наноносителей. Важными параметрами таких носителей являются их размер, поверхность и электрокинетический потенциал (ξ -potential), которые определяют процесс распределения и функционирования микрочастиц в организме. Перспективным материалом в качестве платформы для депонирования лекарственных препаратов в такие носители является семейство биоразрушаемых полимеров микробиологического происхождения – полигидроксиалканоаты (ПГА).

Цель настоящей работы – исследование влияния химического состава полимера, условий получения, концентрации инкапсулируемого препарата, оттока препарата, а также рН изменений среды на электрокинетический потенциал ПГА микрочастиц.

Показано, что с изменением химического состава полимера меняется поверхность микрочастиц, а также размер и электрокинетический потенциал. Так, микрочастицы на основе сополимера с 3-гидроксивалератом (6,5 мол.%) имеют оптимально низкие значения размера и ξ -потенциала.

Установлено, что метод получения частиц влияет на величину электрокинетического потенциала. Однако, независимо от способа получения микрочастицы на основе гомополимера, имеют отрицательные значения ξ -потенциала от -20 мВ (эмульсионный метод) до -95 мВ (метод распылительного высушивания).

Установлено, что на величину ξ -потенциала также оказывает влияние степень нагружения микрочастиц лекарственными препаратами, сопровождающееся изменением физической стабильности при инкубировании в течение 30 суток в сбалансированном фосфатном буфере. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для всех исследуемых образцов, нагруженных препаратами, свойственно изменение электрокинетического взаимодействия между частицами в течение первых дней наблюдения, когда происходит стремительный отток препарата в среду. Когда ежедневная доля выхода препарата снижается, ξ -потенциал имеет достаточно стабильные значения.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о стабильности разработанных форм в сбалансированном фосфатном буфере и перспективности использования ПГА в качестве биodeградируемого матрикса для создания лекарственных препаратов длительного действия.

Опытное производство полигидроксиалканоатов

Е.Г. Киселёв, науч. рук. д.б.н., проф. Т.Г. Волова

Институт биофизики СО РАН

Реализован и исследован периодический процесс синтеза полигидроксиалканоатов культурой *C. eutrophus* на глюкозе при изменении внутриклеточного пула полигидроксиалканоатов (ПГА), физиологической активности и плотности инокулята, режима транспорта кислорода.

Установлено, что при концентрации глюкозы от 5 до 35 г/л и исходном содержании полимера в инокуляте не выше 10 %, концентрация биомассы и содержание полимера достигают (110 ± 10) г/л и (80 ± 5) %. Продуктивность процесса по биомассе и полимеру составила 1,7 и 1,45 г/л·ч соответственно, что в два раза выше ранее достигнутых показателей культурой *R. eutrophus* B5786 на фруктозе [1, 2].

На основании проведённых исследований процессов экстракции из биомассы клеток с использованием поверхностно-активных веществ, неполярных растворителей, их смесей с этанолом при варьировании параметров процесса, разработан комбинированный метод экстракции, обеспечивающий выход высокоочищенного полимера без существенного изменения молекулярно-массовых характеристик. В результате чего удалось сократить объём органических растворителей используемых в процессе и как итог снизить их расход до 4,4 кг/кг ПГА. Комбинированный метод позволил достичь высокой степени извлечения ПГА – порядка 98,5 – 99,0 %, конечный продукт полученный таким способом не содержит эндогенных примесей и может применяться в медицинских целях. При обработке данных многофакторного эксперимента получено уравнение регрессии.

Выполнено технико-экономическое обоснование производства при различных субстратных сценариях. Определены основные затраты на синтез ПГА в автотрофном и гетеротрофном режиме, которые варьируются от 230 до 730 руб/кг, при прогнозной производительности 100 000 т/г.

На основании экспериментальных данных и их анализа разработана технология опытного производства синтеза ПГА на глюкозе с использованием водородных бактерий *C. eutrophus*, подготовлен комплект технологической документации в соответствии с требованиями ЕСТД.

Технология реализована в проекте опытного производства «Лаборатория биотехнологии новых биоматериалов».

В настоящее время ведутся работы по повышению энергоэффективности производства. Рассматривается возможность получения дополнительных продуктов.

Литература:

- [1] T.G. Volova, E.G. Kiselev, O.N. Vinogradova, E.D. Nikolaeva, A.A. Chistyakov, A.G. Sukovaty, E.I. Shishatskaya. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs // PloS One. 2014. 9. e87551.
- [2] Т.Г. Волова, Н.А. Войнов, В.С. Муратов, Н.В. Бубнов, К.В. Гурулев, Г.С. Калачева, Н.В. Горбунова, В.Ф. Плотников, Н.О. Жила, Е.И. Шишацкая, О.Г. Беляева Опытное производство разрушаемых биополимеров // Биотехнология. 2006. 6. 28-34.

Остеогенный потенциал полимерных пористых матриц из ПГА для регенерации костного дефекта черепа крыс

А.А. Шумилова^{1,2}, науч. рук. д.м.н. Е.И. Шишацкая^{1,2}

1 – Сибирский федеральный университет

2 – Институт биофизики СО РАН

В последнее время наблюдается постоянный рост числа пациентов с дефектами черепа, что связано с увеличением количества черепно-мозговых травм и ростом хирургической активности при опухолях и патологии сосудов головного мозга. Поиск новых и совершенствование известных остеопластических материалов становится первостепенной задачей краниопластики. Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют большой интерес для восстановительной хирургии костных тканей в силу их медленной биорезорбции *in vivo* и механической прочности.

Цель работы – исследование остеогенного потенциала полимерных пористых матриц из ПГА на модели костного дефекта черепа крыс.

В работе получены и исследованы два типа экспериментальных образцов полимерных матриц разной геометрии на основе поли-3-гидроксибутирата. Первый тип изделий представлял собой пористые 3D имплантаты, полученные техникой выщелачивания. Второй тип полимерных изделий, прессованные пластины, обрабатывали CO₂-лазером (LaserProExplorer II) в режиме растровой и векторной гравировки, при мощности $\nu=4$ %, скорости $P=100$ %, разрешении ($dpi=1000$). Способность полимерных носителей из ПГА поддерживать адгезию, пролиферацию и направленную дифференцировку клеток исследована в культуре ММСК, выделенных из костного мозга и жировой ткани крыс линии Wistar. Дифференцировка ММСК в остеобласты подтверждена ПЦР в режиме «реального времени» экспрессией генов остеокальцина (BGP), окрашиванием клеток антителами к остеопонтину и активностью внутриклеточной щелочной фосфатазы. На модели костного дефекта черепа крыс исследованы пористые 3D имплантаты из ПЗГБ, в композиции с остеобластами, дифференцированными из ММСК жировой ткани. Динамика заполнения дефекта новообразованной костной тканью определена в двух проекциях, фронтальной и аксиальной. По данным гематологических показателей и активности щелочной и кислой фосфатаз, в экспериментальной группе не зарегистрировано отклонение показателей от нормы. Через 120 суток дефект полностью закрылся при заполнении его экспериментальным полимерным имплантатом с остеобластами и не превышал 10 % от исходного (0,5 мм). В группе отрицательного контроля и группе сравнения размер дефекта оставался на уровне 1,0-1,2 мм.

Микробиологический синтез и свойства новых типов многокомпонентных полигидроксиалканоатов

Д.А. Сырвачева, О.Н. Виноградова, науч. рук. д.б.н., проф. Т.Г. Волова
Институт биофизики СО РАН

Природные полиэфиры - полигидроксиалканоаты (ПГА) – синтезируют прокариотические микроорганизмы в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса. Наибольший интерес среди известных ПГА вызывают сополимерные образцы. Связано это с тем, что в зависимости от состава и соотношения мономеров в ПГА их базовые физико-химические свойства изменяются в широких пределах [1]. Прежде всего, это относится к степени кристалличности и температурным показателям – параметрам, которые определяют условия переработки полимеров и характеристики получаемых изделий.

Целью настоящей работы явилось исследование способности природного штамма *Cupriavidus eutrophus* В10646 синтезировать 3-хкомпонентные сополимерные ПГА, а также изучение их физико-химических и физико-механических характеристик.

Бактерии культивировали в гетеротрофных условиях, где в качестве основного углеродного субстрата использовали фруктозу или масляную кислоту, а в качестве субстратов-предшественников для синтеза мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ), 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) или 4-гидроксибутирата (4ГБ) – соли валериановой (пропионовой) кислоты, 3-гексановой кислоты или γ -бутиролактон, соответственно. В качестве ингибитора пути β -окисления жирных кислот в среду добавляли акрилат натрия для увеличения содержания мономеров ЗГГ в сополимерах П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ). Варьируя концентрацию подаваемых веществ и время добавок получили трехкомпонентные ПГА – П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) с включением ЗГВ от 7 до 41 мол.%, ЗГГ от 2 до 55 мол.% и П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) с включением ЗГВ от 7 до 18,5 мол.%, 4ГБ от 26,3 до 61 мол.%. С применением современных методов анализа в сравнительном аспекте исследованы физико-химические (молекулярная масса, степень кристалличности, температуры плавления и термической дегградации), физико-механические (модуль Юнга, напряжение на разрыв, удлинение при разрыве) свойства и свойства поверхности (РЭМ, АСМ, краевые углы смачивания) сополимерных ПГА различного химического состава.

Таким образом, установлено, что 3-хкомпонентные ПГА в сравнении с ПЗГБ имеют значительно более низкую степень кристалличности и более низкие значения температуры плавления и термической дегградации. Пленки из всех исследованных типов 3-хкомпонентных ПГА имеют более высокие показатели прочности и эластичности, по сравнению с ПЗГБ.

Литература:

[1] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant // Prog. Polym. Sci. 2013, 38, 536-583.

Реконструкция палеоклимата озера Шира по биомаркерам его донных отложений

*В.В. Зыков, науч. рук. к.ф.-м.н., с.н.с. Д.Ю. Рогозин
Институт биофизики СО РАН*

Озеро Шира является известным курортом, целебные свойства воды которого, обеспечивает наличие в воде сероводорода, производимого сульфатредуцирующими бактериями на дне озера. Для озера Шира, имеющего развитое аноксигенное фототрофное сообщество индикатором анаэробных условий в прошлом, является присутствие в донных отложениях каротиноида окенона, фотопигмента специфичного для пурпурных серных бактерий. Был проведен анализ замороженного керна верхних донных отложений, отобранного с помощью специального пробоотборника-намораживателя, изготовленного в Институте биофизики СО РАН по материалам Renderg [1]. Керна был взят в марте 2013 года, нам удалось отобрать неповрежденными верхние (жидкие) донные отложения, сформировавшиеся за время проведенного Институтом биофизики СО РАН сезонного мониторинга (2002-2013 г.) [2], что позволило сопоставить состав ископаемых фотопигментов с современным состоянием водоема. Из донных отложений были экстрагированы фотопигменты и полученным данным был составлены профили вертикального распределения пигментов в верхних слоях донных отложений (рис. 1). На рис. 1 можно видеть, что в пигментном составе слоев наблюдается следующая картина в зоне № 0-15, что соответствует времени мониторинга в больших количествах (ок. 500 мкг/г) присутствует окенон, данная картина соответствует состоянию озера с современными условиями [3]. В образцах № 38-46 окенон отсутствует полностью (что говорит об отсутствии сероводородной зоны), так же это время соответствует периоду пониженного уровня озера (ок. 16 м), при котором озеро, вероятно, переходит в полноперемешиваемый режим. Исходя из этих данных, мы можем сказать, что за период с 1945 года никаких изменений не происходило и с точки зрения пигментного анализа донных отложений мы имеем право использовать данные мониторинга озера для интерпретации состава донных отложений.

Работа выполнена при поддержке ККФН (Доп. Соглашение № 38 от 10 ноября 2014 г.)

Литература:

- [1] Renberg I., Hansson H. A pump freeze corer for recent sediments // *Limnol. Oceanogr.* 1993. 38(6). P. 1317-1321.
- [2] Rogozin D. Y., Genova S. N., Gulati R. D., Degermendzhy A. G. Some generalization based on stratification and vertical mixing in meromictic Lake Shira, Russia, in period 2002-2009 // *Aquatic Ecology.* 2010. V. 44, № 3. P. 485-496.
- [3] Зыков В.В., Рогозин Д.Ю., Калугин И.А., Дарьин А.В. Дегерменджи А.Г. Каротиноиды в донных отложениях озера Шира (Россия, Хакасия) как палеоиндикатор для реконструкции состояния озера // *Сибирский экологический журнал.* 2012. № 4.

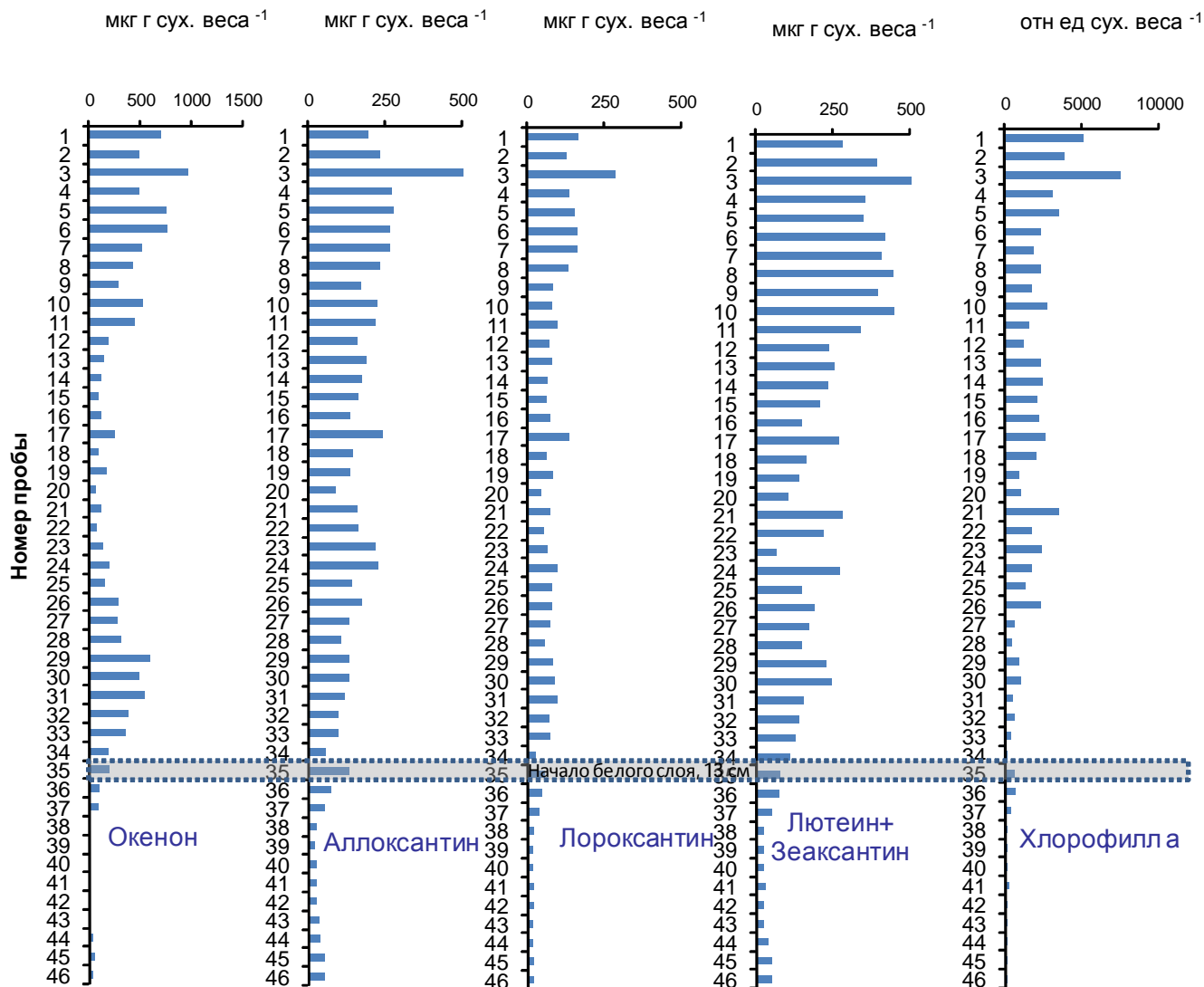


Рис. 1 Профили вертикального распределения фотопигментов в замороженном керне верхних отложений озера Шира. Верхние слои соответствуют времени отбора – началу 2013 г, начало белого слоя датируется 1945 годом [3]. Пробы брались с примерно равными промежутками ок. 5 мм.

Детонационные наноалмазы в создании многоразовой системы определения мочевины

*м.н.с. Н.О. Ронжин, науч. рук. д.б.н., зав. лаб. В.С. Бондарь
Институт биофизики СО РАН*

Химически полиморфная, активная поверхность модифицированных наноалмазов (МНА) детонационного синтеза, обладающих высокой коллоидной стабильностью в дисперсионных средах [1, 2], позволяет прогнозировать их применение в качестве носителя (основы) для создания многоразовых систем биохимического определения компонентов биологических жидкостей.

В работе демонстрируется применимость МНА в конструировании многоразовой системы биохимического определения мочевины *in vitro*.

В работе использовали МНА марки RUDDM 0-125 ($d_{50} = 49,6$ нм), производимые ООО «Реал-Дзержинск» (Россия) по технологии, разработанной в ИБФ СО РАН [1].

При создании биохимической тест-системы все реагенты, калибровочный раствор мочевины и раствор уреазы были использованы из набора «Новокарб» (Вектор-Бест, Россия) для ферментативного определения мочевины.

Систему определения мочевины получали посредством ковалентной иммобилизации фермента уреазы на поверхность частиц МНА, предварительно функционализированную бензохиноном.

Функциональную активность полученного комплекса МНА-уреазы оценивали салицилат-гипохлоритным методом, основанным на образовании окрашенного продукта реакции, которой выявляется спектрофотометрически при длине волны 700 нм.

Установлено, что после ковалентной иммобилизации на частицы МНА уреазы проявляет каталитическую активность. Созданная тест-система МНА-уреазы: обеспечивает линейный выход продукта в широком интервале низких концентраций аналита; позволяет осуществлять многократное тестирование мочевины с постоянным уровнем выхода продукта; может функционировать в фосфатном буфере и деионизованной воде.

Полученные данные имеют практическое значение и позволяют прогнозировать применимость сконструированной тест-системы для целей клинической диагностики.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Президиума РАН (программа № 24, проект 57).

Литература:

- [1] В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // ФТТ. 2004, 46 (4), 698-701.
- [2] Gibson N. et. al. // Diam. Relat. Mater. 2009, 18, 620-626.

Выявление однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с риском развития ряда патологий, биолюминесцентным анализом

*Е.Е. Башмакова, науч. рук. д.б.н. Л.А. Франк
Сибирский федеральный университет*

Выявление генетических полиморфизмов имеет важное значение для исследования генетических основ заболеваний, оценки предрасположенности к тем или иным патологиям, индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам и т.д.

В лаборатории фотобиологии был разработан способ выявления однонуклеотидных полиморфизмов на основе реакции удлинения специфического праймера с последующим одновременным выявлением аллельных вариантов биолюминесцентным анализом. В настоящей работе этот способ использовали для генотипирования трех полиморфизмов в гене меланокортинового рецептора первого типа (MC1R) ассоциированных с фенотипом («red-hair mutations») и имеющих связь с риском развития меланомы и немеланомного рака кожи. Исследованы модельные плазмиды со вставкой полиморфного фрагмента гена MC1R (нормального варианта и с патологическими мутациями rs1805007; rs1805008; rs1805009), а также ряд ДНК из клинических образцов. Результаты биолюминесцентного анализа подтверждены секвенированием.

Разработан метод одновременного определения полиморфизмов 4-х разных генов ассоциированных с риском развития нарушений системы гемостаза. Три из них: мутация Лейден (FV, rs6025), полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR, rs1801133) и мутация гена протромбина (FII, rs1799963) повышают риск развития тромботических явлений и развития тромбофилии. Четвертый полиморфизм – полиморфизм гена фактора свертываемости VII (FVII, rs 6046), как предполагают, имеет защитный эффект относительно риска развития тромбозов. Определение данных полиморфизмов важно в комплексе, поскольку тромбофилия – многофакторное заболевание, являющееся результатом совместного воздействия внешних факторов и генетических вариантов нескольких генов. Генотипирование значительного количества образцов ДНК на наличие исследуемых четырех полиморфизмов проводили в мультиплексном варианте и по-отдельности. Полученные результаты полностью совпали с таковыми, полученными лицензированным методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Таким образом, разработанный биолюминесцентный метод позволяет достоверно выявлять полиморфизмы как в одном гене, так и одновременно в разных генах. Использование мультиплексного варианта уменьшает временные и экономические затраты при скрининге полиморфизмов разных генов. Для определения же полиморфных вариантов гена MC1R, разработанный метод является альтернативой прямому секвенированию, которое применяют для исследования данных мутаций, ассоциированных с риском развития меланомы.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского научного фонда (проекты № 14-14-01119 и 14-35-00107).

Новая 16,5 кДа-изоформа люциферазы из *Metridia longa*: получение и характеристика

М.Д. Ларионова, науч. рук. к.б.н. Е.С. Высоцкий

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ

Институт биофизики СО РАН

Люцифераза из морских копепод *Metridia longa* – секретируемый фермент, окисляющий целентеразин с испусканием голубого света ($\lambda_{\max}=485$ нм). Ранее были идентифицированы гены двух изоформ люциферазы *Metridia* – MLuc39 и MLuc164, кодирующих 21 кДа и 22 кДа белки [1, 2]. Обе изоформы были успешно использованы в качестве эффективных биолюминесцентных репортеров, как в модельных *in vitro* анализах, так и в исследованиях *in vivo* для визуализации внутриклеточных процессов в клетках млекопитающих.

В данной работе описана экспрессия, очистка и характеристика новой изоформы люциферазы *Metridia* – MLuc7 размером 16,5 кДа, являющейся самой малой по размеру из известных на сегодняшний день люцифераз. Люцифераза MLuc7 характеризуется большей биолюминесцентной активностью в сравнении с другими изоформами, что позволяет ее считать более перспективным биолюминесцентным репортером.

Люцифераза *Metridia* содержит 10 консервативных Cys-остатков и, предположительно, 5 дисульфидных связей. Возможно поэтому попытки получить гомогенные препараты высокоактивной рекомбинантной люциферазы в достаточном количестве при экспрессии в клетках *E. coli* были безуспешны. Только при использовании экспрессионной системы «Vac-to-Vac» и клеток из *Spiroptera frugiperda* (Sf9) удалось осуществить высокоэффективную экспрессию MLuc7 при секреции в культуральную среду. Процедура очистки секретируемой люциферазы была разработана и оптимизирована. Выход чистого высокоактивного гомогенного белка составил до 3 мг/л.

Описаны некоторые физико-химические и биохимические свойства люциферазы MLuc7, полученной путем рефолдинга из бактериальных телец включения и выделенной с помощью бакуловирусной экспрессионной системы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-14-01119.

Литература:

- [1] Markova S.V., Golz S., Frank L.A., Kalthof B., Vysotski E.S. // J Biol Chem. 2004; 279: 3212-7.
- [2] Borisova V.V., Frank L.A., Markova S.V., Burakova L.P., Vysotski E.S. // Photochem Photobiol Sci. 2008; 7: 1025-31.