

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
Биологический факультет**

**Краткое описание задач практикума  
по нанобиотехнологиям кафедры биофизики**

**МОСКВА  
2010**

## Содержание

1. Применение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в эритроцитах
2. Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом
3. Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов
4. Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов
5. Модификация активности антиоксидантных ферментов крови наночастицами серебра *in vitro*
6. Молекулярно-механическое моделирование свойств углеродных нанотрубок.
7. Определение эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET), фёрстеровского радиуса и константы скорости переноса энергии от квантовых точек к биологическим акцепторам
8. Современные методы моделирования белок-белковых взаимодействий
9. Проникновение метилвиологена в растительную клетку под действием возбуждения, вызванного электрическим стимулом
10. Диссипативные структуры в реакции Белоусова-Жаботинского с реагентами, диспергированными в АОТ микроэмульсии
11. Влияние наноматериалов на функционирование миелиновых нервных волокон
12. Исследование фотодинамического действия наночастиц сенсibilизаторов разных типов на микроорганизмы
13. Транспорт неэлектролитов через природные мембранные нанопоры
14. Изучение токсичности наноматериалов с использованием флуоресценции микроводорослей

## Задача №1.

# «Применение спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в эритроцитах»

Браже Н.А., Браже А.Р.

### Аннотация задачи

Одним из актуальных направлений нанотехнологий является создание наночастиц, использующихся в биомедицинских исследованиях для усиления сигнала (интенсивности флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) света), регистрируемого от объектов: клеток, белков и нуклеиновых кислот, биологических мембран и низкомолекулярных компонентов клетки. В спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, англ. SERS – surface enhanced Raman spectroscopy) к исследуемому объекту добавляют наночастицы (НЧ) серебра или золота, реже — наночастицы меди, палладия или сплава серебра с золотом, на поверхности которых возникают плазмонный резонанс и перенос заряда, что приводит к увеличению рамановского сечения исследуемых молекул более, чем в  $10^5$ - $10^6$  раз. Теоретически величина коэффициента усиления может достигать  $10^{11}$ - $10^{14}$  что может позволить детектировать даже единичные молекулы. Упомянутые эффекты позволяют исследовать конформацию молекул при концентрации менее  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  М. Усиление сигнала КР на поверхности НЧ возникает только тогда, когда расстояние между НЧ и исследуемой молекулой составляет не более чем 15-20 нм, что дает возможность говорить о пространственной локализации молекулы.

Одним из самых перспективных направлений спектроскопии ГКР является исследование локализации и конформации молекул внутри живых клеток, прикрепленных к подложке с нанесенными наноструктурами из серебра или золота, или внутри живых клеток, к которым добавлен раствор с наночастицами серебра или золота.

Наглядным примером для демонстрации применения спектроскопии ГКР для исследования конформации и свойств молекул в составе живых клеток являются эритроциты. Основное содержимое эритроцитов — гемоглобин, который условно можно разделить на две фракции: цитоплазматический Гб<sub>ц</sub>, находящийся в цитоплазме, и мембранносвязанный Гб<sub>мс</sub>, связанный на плазматической мембране на цитоплазматическом домене белка полосы 3 (фионного обменника АЕ1). Гемопорфирин гемоглобина обладает интенсивным комбинационным рассеянием, зависящим от

конформации самого гема и глобина — белковой части Гб. В настоящее время единственным способом для исследования конформации и  $O_2$ -связывающих свойств мембранносвязанного Гб<sub>мс</sub> в интактных эритроцитах является метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния. Добавление коллоидного раствора серебра к разбавленному раствору эритроцитов приводит к сорбции наночастиц серебра (НЧС) на поверхность клеток, а плазмонный резонанс, возникающий на поверхности наночастиц, приводит к многократному усилению сигнала КР от мембранносвязанного Гб. При использовании НЧС сигнал КР от цитоплазматического гемоглобина практически не усиливается, поскольку весь Гб<sub>ц</sub> находится в цитоплазме эритроцита на глубине более, чем 15 нм. При этом, концентрация Гб<sub>мс</sub> в эритроцитах слишком мала, чтобы можно было регистрировать его сигнал КР без НЧС. Таким образом, методом спектроскопии ГКР с наночастицами серебра для разбавленных суспензий эритроцитов можно исследовать конформацию и свойства мембранносвязанного Гб, а методом традиционной спектроскопии резонансного и нерезонансного КР можно исследовать конформацию и свойства цитоплазматического Гб в интактных эритроцитах.

**Цель задачи:** освоение методов спектроскопии гигантского и традиционного резонансного и нерезонансного комбинационного рассеяния в применении к эритроцитам и сравнительное исследование конформации и кислород-связывающих свойств мембранносвязанного и цитоплазматического гемоглобина в интактных эритроцитах.

**Объекты исследования:** эритроциты крысы и изолированный цитоплазматический гемоглобин.

**Методы:** спектроскопия ГКР с использованием коллоидного раствора серебра, традиционная спектроскопия КР и абсорбционная спектроскопия.

**План работы:**

1. Получение коллоидного раствора серебра путем восстановления  $AgNO_3$  гидросиламином гидрохлоридом и нахождение оптимальных условий реакции. Контроль качества полученного коллоидного раствора наночастиц серебра по спектрам поглощения коллоидного раствора.
2. Определение оптимальных концентрации эритроцитов в исследуемой пробе и соотношения объемов суспензии эритроцитов и коллоидного раствора серебра для получения максимального сигнала ГКР от гемоглобина в эритроцитах. Обоснование требований к оптимальным условиям, при которых коллоидный раствор серебра не влияет на свойства эритроцитов.

3. Регистрация спектров ГКР эритроцитов при различных концентрациях эритроцитов в суспензии и разных соотношениях объемов суспензии эритроцитов и коллоидного серебра.
4. Применение традиционной спектроскопии КР для изучения конформации и свойств цитоплазматического гемоглобина в интактных эритроцитах и сравнение спектров ГКР и КР.
5. Выделение цитоплазматического гемоглобина из эритроцитов и определение оптимальных условий ГКР спектроскопии для исследования изолированного Гб. Сопоставление спектров ГКР от эритроцитов и изолированного Гб.
6. Применение различных алгоритмов для обработки КР и ГКР спектров и вычитания базовой линии.
7. Выводы по проделанной работе.

#### **Предполагаемые результаты и навыки:**

- Освоение методики приготовления коллоидного раствора серебра, приводящего к усилению сигнала КР от гемоглобина в составе эритроцитов и изолированного Гб;
- Освоение методов спектроскопии ГКР и КР в применении к эритроцитам и изолированному гемоглобину;
- Приобретение навыков анализа спектров КР и ГКР гемоглобина с использованием различного программного обеспечения;
- Приобретение навыков оценивания изменений конформации Гб и его  $O_2$ -связывающих свойств по спектрам КР и ГКР.

Полученные результаты продемонстрируют зависимость конформации и свойств Гб от места его локализации в клетке. Задача ознакомит нанотехнологов, физиков и химиков с особенностями применения наночастиц в спектроскопии ГКР для исследования свойств живых клеток, а биологов — с возможностью получать дополнительную информацию о структуре и свойствах биомолекул при использовании наночастиц серебра или золота.

#### **Оценка итогов проведенного практикума**

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

1. краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием преимуществ спектроскопии КР и ГКР для исследования объекта;
2. четко сформулированные цели и задачи исследования;
3. описание основных методов исследования;
4. корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме

результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;

5. четкие выводы по полученным результатам;
6. список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами устную беседу, в ходе которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

## Задача № 2

### «Методы приготовления и анализа моноламеллярных липосом»

Паршина Е.Ю.

#### Аннотация задачи.

Наноразмерные липосомы являются широко используемым в настоящее время объектом нанотехнологий. Несмотря на то, что липосомы впервые были описаны в 1963 г. А. Бэнгхэм, а основное развитие это направление получило в 80-е годы, когда были запатентованы основные методы получения липосом, в настоящее время интерес к данным искусственным мембранным структурам с позиции нанобиотехнологии возрастает. Исследование новых типов липосом осуществляется в различных направлениях. Липосомы традиционно используются как модельный объект, имитирующий клеточную мембрану, при этом объектом исследования может быть как собственно липидный компонент мембраны, так и белок-липидные взаимодействия, если в мембрану встроены молекулы белка. Липосомы могут быть использованы для доставки различных компонентов в живую клетку. Это могут быть и встроенные в мембрану липосом амфифильные или гидрофобные молекулы лекарственных препаратов или биологически активных соединений, и заключенные в водную фазу липосом растворимые соединения, а также липосомы могут быть использованы для доставки генетического материала в клетки. Технологии, связанные с приготовлением липосом, применяются во многих областях, начиная от косметической и пищевой промышленности и заканчивая наукоемкими технологиями и передовыми разработками в области фармакологии, биологии и медицины. Методы, применяемые для приготовления липосом, чрезвычайно разнообразны и варьируют в зависимости от целей исследования. Данная практическая работа позволит студентам освоить некоторые методические подходы приготовления моноламеллярных липосом, а также изучить методы оценки качества полученных суспензий липосом. Это методы определения распределения липосом по размерам и свойств липосомальной мембраны. В рамках практикума по бионанотехнологиям для студентов 4 курса кафедры биофизики биологического факультета МГУ методы приготовления липосом также рассматриваются в задаче «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран», однако данная задача позволяет более подробно рассмотреть различные методы приготовления липосом и способы их анализа.

**Цель работы:** освоение методов получения моноламеллярных липосом, липосом с включенными в мембрану молекулами  $\beta$ -каротина и белков, определение размеров липосом и структурного состояния их мембраны.

**Объекты исследования:** моноламеллярные липосомы.

Используемые методы: методы ультразвуковой обработки и экструзии (приготовление липосом), динамическое светорассеяние, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), ЭПР-спектроскопия спиновых зондов 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5-ДС и 16-ДС), встроенных в мембраны липосом.

**План работы:**

1. Изучение общих принципов и подходов в приготовлении липосом и приготовление липосом из гомогенизированной в буфере смеси фосфолипидов и гидратированной липидной пленки путем ультразвуковой обработки и экструзии, с включением в состав липидного бислоя молекул  $\beta$ -каротина.

2. Изучение основ метода динамического светорассеяния и определение размера приготовленных липосом (измерение размера липосом проводится в лаборатории факультета наук о материалах МГУ совместно с Е.А. Гудиным).

3. Регистрация спектров ЭПР 5- и 16-ДС, встроенных в мембрану липосом. Обработка полученных спектров ЭПР, оценка вязкости липидного матрикса различных образцов. Данная часть цикла знакомит студентов с методом контроля вязкости мембран липосом, метод может быть использован при модификации состава или структуры искусственных мембран.

4. Анализ структуры мембраны приготовленных липосом при помощи спектроскопии КР. Упорядоченность мембраны оценивается по спектрам жирнокислотных цепей фосфолипидов, входящих в состав липосом.

5. Анализ структуры мембраны липосом по спектрам резонансного КР инкорпорированных в липидный бислой молекул каротина, изучение подходов к обработке спектров КР.

**Предполагаемые результаты:** в процессе выполнения задачи студенты освоят методы приготовления моноламеллярных липосом, методы анализа их размеров и структуры мембран (динамическое светорассеяние, спектроскопия ЭПР и КР). Будут получены малые моноламеллярные липосомы, определены их размеры и структурное состояние их мембран, что позволит выбрать условия приготовления липосом с

заданными свойствами. Будет освоена методика приготовления липосом с модифицированным составом мембраны – с включенными в состав мембраны молекулами  $\beta$ -каротина.

#### **Оформление результатов и их обсуждение.**

1. Отчет по задаче оформляется в виде небольшой научной работы и включает разделы «Введение», «Цели и задачи», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения» и «Выводы». Цели и задачи должны быть сформулированы четко и кратко.

2. В разделе «Материалы и методы» необходимо отразить основные методы приготовления липосом, использованные в данной работе.

3. В разделе «Результаты и обсуждения» должны быть представлены результаты измерения размеров липосом методом динамического светорассеяния и произведено сравнение липосом, полученных разными способами. Также должны быть представлены спектры КР, РКР и ЭПР для различных образцов липосом, а также параметры, рассчитанные по данным спектрам. Необходимо произвести сравнительный анализ свойств мембраны различных образцов липосом и обсудить возможные причины наблюдаемых различий (или отсутствия таковых).

4. По полученным в работе результатам необходимо написать развернутые выводы.

### Задача №3

#### **«Методы модификации состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов»**

**Паршина Е.Ю., Браже Н.А., Лунева О.Г.**

#### **Аннотация задачи**

Одним из направлений нанобиотехнологий является направленная модификация определенных свойств живой клетки (в частности, свойств липидного бислоя плазматической мембраны) с последующим использованием в практических целях или в фундаментальных исследованиях. Важными задачами такого направления являются разработка методов модификации клеток, способов контроля и отбора модифицированных клеток, а также методов для исследования клеточных процессов и отдельных молекул в живых клетках с заданной пространственной локализацией. Данная задача направлена на освоение способов модификации состава и свойств плазматической мембраны, а также связанных с мембраной белков живых клеток (на примере эритроцитов млекопитающих), методов получения используемых в нанобиотехнологических подходах для модификации состава мембран наноразмерных липосом и осуществлению контроля эффективности выполненной модификации.

Известно, что биологические мембраны представляют собой гетерогенные бислойные наноструктуры толщиной около 8-10 нм и играют важнейшую роль в функционировании клеток. Актуальной научной задачей является изменение структуры и состава плазматической мембраны живой клетки и изучение зависимости клеточных процессов от свойств мембраны. Эритроциты млекопитающих являются ярким и удобным для исследования примером клеток, свойства которых зависят от состояния плазматической мембраны. В частности, известно, что содержание холестерина в мембране эритроцита существенно влияет на вязкость липидного матрикса мембраны (Casseraa et al., 2002), а также активность ионно-транспортных систем, например, Na/H-обменника и Ca-АТФазы, анионного обменника AE1 (белка полосы 3) (Bernhardt, Ellory, 2003). Можно предположить, что липидный состав и вязкость мембраны опосредованно через белок AE1 оказывают влияние на конформацию и O<sub>2</sub>-связывающие свойства гемоглобина, связанного на белке AE1, а также на оксигенацию всего гемоглобина, содержащегося в эритроците, что непосредственно может оказать влияние на выполнение эритроцитами кислородтранспортной функции. Кроме того, изменение состава липидной части мембраны эритроцита может привести к изменению жесткости мембраны, что может сказаться на способности эритроцитов проходить через мелкие капилляры и повлиять на обеспечение тканей кислородом.

Для модификации липидного состава мембраны живых клеток, в частности, уменьшения содержания в мембране холестерина и разрушения липидных рафтов, значительную роль в образовании которых играет холестерин, используются вещества, экстрагирующие холестерин из мембраны, в частности метил- $\beta$ -циклодекстрин. Для насыщения мембраны холестерином используют раствор холестерина в метил- $\beta$ -циклодекстрине. Кроме того, для изменения липидного состава мембран широко используются липосомы с различным липидным составом. Инкубация эритроцитов с метил- $\beta$ -циклодекстрином и липосомами приводит к изменению липидного состава мембраны и, возможно, к изменению вязкости мембраны и свойств трансмембранных и связанных с ними белков. Одним из прямых методов, позволяющих контролировать эффективность произведенной модификации свойств мембраны, является метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых зондов на основе стеариновой кислоты с различным расположением парамагнитного фрагмента. В данной задаче использование двух спиновых зондов позволяет проводить контроль вязкости плазматической мембраны на глубинах 0.6 и 2.2 нм от поверхности. По изменениям в спектрах ЭПР спиновых зондов можно судить об изменении вязкости мембраны и, следовательно, встраивании или удалении холестерина из мембраны. Для оценки повреждающего воздействия производимых манипуляций на клетки необходимо использовать дополнительные микроскопические методы контроля общего состояния исходных и модифицированных клеток. В рамках данной задачи предлагается использовать световую микроскопию для исследования влияния модификации мембраны эритроцитов на их морфологию. При выполнении задачи «Методы комплексного исследования действия нанообъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов» предлагается более детальное комплексное исследование модифицированных клеток методом лазерной интерференционной микроскопии. Данные методы позволяют оценить морфологию и компартиментализацию клеток и выявить наличие или отсутствие патологических изменений в структуре клеток, произошедших в результате модификации состава плазматической мембраны. Методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) можно зарегистрировать изменения конформации примембранного гемоглобина в эритроцитах и, таким образом, исследовать влияние изменения структуры мембраны на свойства примембранного гемоглобина.

**Цели работы:** исследовать влияния холестерина на свойства эритроцитарной мембраны методом ЭПР-спектроскопии (метод спиновых зондов), форму клеток и свойства примембранного гемоглобина, освоить методы модификации состава плазматической мембраны в живых клетках, методы приготовления наноразмерных липосом,

используемых для модификации состава мембраны.

Объекты исследования: эритроциты крыс.

Используемые методы: абсорбционная спектроскопия, методы ультразвуковой обработки и экструзии (приготовление липосом), ЭПР-спектроскопия спиновых зондов 5- и 16-доксилстеариновых кислот (5-ДС и 16-ДС), встроенных в биологические мембраны, световая микроскопия, спектроскопия ГКР с использованием наночастиц серебра.

#### **План работы:**

- Выделение крови, получение суспензии эритроцитов.
- Получение эритроцитов с уменьшенным и увеличенным содержанием холестерина в составе плазматической мембраны путем инкубации эритроцитов с метил- $\beta$ -циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из плазматической мембраны, и с раствором холестерина в метил- $\beta$ -циклодекстрине, увеличивающем содержание холестерина в мембране, соответственно.
- Изучение общих принципов и подходов в приготовлении липосом и приготовление липосом из гомогенизированных в буфере фосфолипидов путем ультразвуковой обработки и экструзии.
- Получение эритроцитов с измененным составом плазматической мембраны путем инкубации эритроцитов с липосомами.
- Контроль целостности мембраны эритроцита (определение гемолиза) в процессе модификации мембраны и наблюдение изменений морфологии эритроцитов с разным содержанием холестерина в плазматической мембране методом световой микроскопии. Данная часть работы посвящена освоению методов контроля состояния живых клеток при направленной модификации состава клеточной мембраны.
- Регистрация спектров ЭПР 5- и 16-ДС, встроенных в плазматическую мембрану контрольных эритроцитов и эритроцитов со сниженным и повышенным содержанием холестерина. Обработка полученных спектров ЭПР, оценка микровязкости липидного матрикса различных образцов. Данная часть цикла знакомит студентов с методом контроля вязкости плазматической мембраны живых клеток, который может быть использован при биотехнологической модификации состава или структуры клеточной мембраны.
- Получение коллоидного раствора серебра путем восстановления  $\text{AgNO}_3$  гидроксиламином гидрохлоридом.
- Определение оптимальных концентрации эритроцитов в исследуемой пробе и соотношения объемов суспензии эритроцитов и коллоидного раствора серебра для получения максимального сигнала ГКР от гемоглобина в эритроцитах. Обоснование

требований к оптимальным условиям, при которых коллоидный раствор серебра не влияет на свойства эритроцитов.

- Получение спектров КР и ГКР от гемоглобина в эритроцитах с повышенным содержанием холестерина. Анализ влияния вязкости и липидного состава плазматической мембраны эритроцитов на конформацию и O<sub>2</sub>-связывающие свойства мембранносвязанного и цитоплазматического Гб в эритроцитах.

#### **Предполагаемые результаты:**

1. Освоение методов приготовления моноламеллярных липосом.
2. Освоение методов модификации липидного состава мембраны (на примере модификации состава мембраны с помощью метил-β-циклодекстрина и липосом)
3. Освоение методов спиновых зондов для определения и контроля вязкости плазматической мембраны живых клеток. Полученные результаты демонстрируют зависимость вязкости мембраны клеток от содержания в них холестерина, и изменение формы эритроцитов при модификации мембранного состава.
4. Освоение методов спектроскопии ГКР и КР в применении к интактным эритроцитам. Приобретение навыков оценивания изменений конформации Гб и его O<sub>2</sub>-связывающих свойств по спектрам КР и ГКР.
5. Данная задача позволит студентам ознакомиться с возможностью применения нанобиотехнологических приемов на примере конкретного исследования. Будут получены навыки как получения наноструктур (получение липосом), так и навыки контролируемой модификации клеток при помощи наноструктур (на примере липосом).

#### **Оценка итогов проведенного практикума**

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать краткое теоретическое введение, четко сформулированные цели и задачи исследования, основные методы исследования, корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов, четкие и логичные выводы по полученным результатам. По представленному отчету преподаватель проводит со студентами зачет, в ходе которого студенты отвечают на вопросы, как по теоретическим основам выполняемой задачи, так и по ходу выполнения работы. В качестве варианта предлагается выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет по проделанной работе студент предъявляет преподавателю и ответственному по практикуму на зачете.

## **Задача №4**

### **«Методы комплексного исследования действия нанобъектов на морфо-функциональные свойства клеток на примере эритроцитов»**

**Юсипович А.И.**

#### **Аннотация**

В рамках настоящей задачи студенты получали навыки исследования действия коллоидных частиц на биологические объекты (эритроциты крысы). Оценка воздействия коллоидов проводилась при помощи методов лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), позволяющей оценить форму, диаметр и содержание гемоглобина в эритроците, методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), способного измерить геометрические размеры (длину, ширину и толщину), а также используя метод спектроскопии комбинационного рассеяния, позволяющего оценить состояние белка гемоглобина – основного компонента эритроцита. Аналогичным образом оценивалось уменьшение и увеличение содержания холестерина в мембранах исследуемых эритроцитов.

#### **ВВЕДЕНИЕ**

В связи с развитием нанотехнологий и расширением использования нанокompозитных материалов актуальной задачей стала оценка воздействия этих наноматериалов на биологические объекты. Это важно не только для оценки безопасности применения наночастиц, но и при их использовании для изучения свойств биологических объектов. Например в случае применения коллоидов серебра для усиления сигнала комбинационного рассеяния, где важно разделить эффекты, обусловленные действием коллоидов и, непосредственно, эффекты обусловленные экспериментальным воздействием.

При этом в силу малых размеров и, в силу этого, высокой реакционной способности, наночастицы могут оказывать воздействие не только на входящие в состав клеток вещества, например белки (воздействие на наноуровне), но и влиять на всю клетку в целом (воздействие на микроуровне клеточной организации). Таким образом, при оценке действия наночастиц наиболее целесообразным является не только и не столько обнаружение наночастиц в различных частях биологического объекта, но и, в первую очередь, определение общего состояния объекта, подвергшегося воздействию наночастиц или наноструктурированных веществ.

Для оценки состояния клеток на микроуровне наиболее логичным представляется использовать какую-либо разновидность микроскопии. Для определения геометрических

размеров эритроцитов (длины, ширины и высоты) использовался метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для оценки других характеристик эритроцитов предлагается использовать разновидность лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) — неинвазивной методики, способной получать высоконтрастные изображения живых объектов без их модификации красителями. Помимо способности получать высоконтрастные изображения, ЛИМ позволяет количественно, с высокой точностью, оценивать фазовую высоту (параметр пропорциональный произведению толщины образца на его показатель преломления) объектов.

Для оценки изменения состояния входящих в состав клетки белков при воздействии коллоидов и модификации мембран используется метод спектроскопии комбинационного рассеяния. Данный метод позволяет неинвазивно и достаточно быстро оценить состояние различных молекул, входящих в состав клеток, оценивая спектр комбинационного рассеяния от образца. Таким образом, сочетание этих двух методов позволит оценивать состояние клетки на различных уровнях ее организации.

Прекрасным тестовым объектом для иллюстрации действия наночастиц на биологические объекты являются эритроциты — наиболее многочисленные форменные элементы крови, основное содержимое которых составляет гемоглобин. Мембрана клеток имеет двойной слой липидных и белковых компонентов и содержит большой набор ферментов. Эритроциты обладают антигенными свойствами, участвуют в гемостазе, но основная роль их — снабжение тканей кислородом и участие в транспорте углекислого газа. Эта функция эритроцитов выполняется за счет способности гемоглобина связываться с газами. Нарушение нормальной работы организма приводит к изменению характеристик эритроцитов (формы, размера, объема, свойств мембраны и т.д.), а также на количестве и свойствах гемоглобина, входящего в состав этих клеток. Кроме того, изменение характеристик самих эритроцитов, например, в результате действия наночастиц, также может привести к изменению характеристик как эритроцитов, так и входящего в их состав, гемоглобина.

Эритроциты — также и наиболее яркий пример клеток, свойства которых зависят от состояния плазматической мембраны. Холестерин является важным компонентом клеточных мембран, в том числе мембран эритроцитов. В мембране эритроцита содержание холестерина составляет порядка 25-30 %. Изменение липидного состава мембраны эритроцитов, в частности, увеличение и уменьшение содержания холестерина, приводит к изменению структуры мембраны. Увеличение содержания холестерина, как правило, приводит к увеличению вязкости и упорядоченности мембраны, снижение содержания холестерина — к снижению упорядоченности и вязкости. Предполагается, что

изменение липидного состава и вязкости мембраны меняют размеры и форму эритроцитов, а также, опосредованно оказывают влияние на конформацию и O<sub>2</sub>-связывающие свойства мембранносвязанного и всего гемоглобина, содержащегося в эритроците, что непосредственно может оказать влияние на выполнение эритроцитами кислородотранспортной функции. Для уменьшения содержания в мембране холестерина в задаче использовался метил-β-циклодекстрин, экстрагирующий холестерин из мембраны. Для насыщения мембраны холестерином использовался раствор холестерина в метил-β-циклодекстрине.

**Целью** настоящей задачи практикума было развитие у студентов навыков самостоятельной работы оценки состояния живых клеток, при действии различных веществ, включая наночастицы.

В результате прохождения задачи студент должен освоить:

методику работы с атомно-силовым микроскопом;

методику работы с лазерным интерференционным микроскопом;

методику работы с рамановским (КР) спектрометром;

получить навыки приготовления препаратов для исследований при помощи микроскопии и КР- спектрометрии;

навыки статистической обработки полученных результатов;

навыки подготовки отчета и презентации полученных результатов.

#### **Объекты исследования**

Объектами исследования являлись эритроциты крыс в условиях *in vitro*, а также фиксированные эритроциты крыс.

#### **Используемые методы**

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия)

Метод лазерной интерференционной спектроскопии

Методика приготовления фиксированных эритроцитов

Метод атомно-силовой микроскопии

#### **План работы**

Выполнение задачи производилось по следующему плану:

1. Выделение крови, получение суспензии эритроцитов (выполняется в рамках задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран» или предоставляется преподавателем).

2. Получение растворов, содержащих коллоиды в различных концентрациях (выполняется в рамках задачи «Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра» или предоставляется преподавателем).
3. Получение эритроцитов с уменьшенным и увеличенным содержанием холестерина путем инкубации эритроцитов с метил- $\beta$ -циклодекстрином, экстрагирующим холестерин из плазматической мембраны, и с раствором холестерина в метил- $\beta$ -циклодекстрине, увеличивающем содержание холестерина в мембране, соответственно (выполняется в рамках задачи «Методы прижизненной модификации липидного состава плазматических мембран интактных клеток с использованием липосом и декстринов и способы оценивания микровязкости липидного матрикса биологических и искусственных мембран» или предоставляется преподавателем).
4. Получение КР-спектров от эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов, инкубируемых в растворе коллоидов различной концентрации (не менее трех измерений от каждой пробы).
5. Фиксация эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра. Изготовление препаратов для АСМ и ЛИМ.
6. Определение геометрических размеров эритроцитов методом АСМ.
7. Оценка морфологии, измерение площади и средней фазовой высоты эритроцитов при помощи ЛИМ (для получения достоверного результата показатели рассчитывают, используя не менее 100 клеток от каждого образца).
8. Обработка КР-спектров, определение отношений пиков КР-спектра для эритроцитов с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра.
9. Определение морфологического индекса, расчет средних значений площади, средней фазовой высоты и содержания гемоглобина в эритроцитах с различным содержанием холестерина и эритроцитов в растворах, содержащих коллоидные частицы серебра методом ЛИМ, а также определение средних размеров эритроцитов методом АСМ.
10. Написание отчета.
11. Сдача отчета.

## Задача №5

### «Модификация активности антиоксидантных ферментов крови наночастицами серебра *in vitro*»

Байжуманов А.А., Паршина Е.Ю.

#### Аннотация задачи

В последнее время в медицине и биологии возник интерес к использованию наночастиц серебра из-за их более широких физико-химических свойств и биологической активности по сравнению с серебром в обычном физико-химическом состоянии. Спектр их применения возрос и в потребительской продукции, начиная от дезинфекции медицинской техники до бытовой техники по очистке воды. Однако при употреблении препаратов содержащих наночастицы серебра - часть из них может попасть в кровь. Ряд современных исследований убедительно доказывает негативные цитотоксические эффекты наночастиц серебра, при этом механизм их цитотоксичности не ясен. Предполагают, что в основе этих эффектов может лежать вызываемый наночастицами серебра окислительный стресс.

Основными антиоксидантными ферментами крови являются супероксиддисмутаза и каталаза. Супероксиддисмутаза катализирует дисмутацию супероксидных анион-радикалов. В крови млекопитающих Cu,Zn- содержащая СОД расположена в основном в эритроцитах, где присутствуют в виде димеров Mr 31300; каждая субъединица содержит один атом меди и один атом цинка. Каталаза катализирует окислительно-восстановительную реакцию, в ходе которой из 2 молекул перекиси водорода образуются вода и кислород. Каталаза (Mr 250000) относится к хромопротеидам, имеющим в качестве простетической (небелковой) группы окисленный гем. Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что возможно связано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую. Сдвиг в работе антиоксидантных ферментов (АФ) приводят к увеличению или снижению активных форм кислорода, что соответственно приводит в итоге к изменениям в содержании конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

**Цели работы:** изучить, влияние наночастиц серебра на СОД и каталазную активности и структуру плазматической мембраны эритроцитов.

**Объекты исследования:** гемолизаты крови, плазма крови, наночастицы серебра, эритроциты млекопитающих.

**Используемые методы:** метод золь-гель\*; метод поверхностного плазмонного резонанса\*; метод динамического светорассеяния\*; спектрофотометрический метод

определения активности супероксиддисмутазы; спектрофотометрический метод определения активности каталазы; гемихромный метод определения концентрации гемоглобина, метод ЭПР.

#### **План работы:**

Получить коллоидные растворы серебра с разными размерами наночастиц\*.

Оценить размеры наночастиц по положению пика плазмонного резонанса на спектрах поглощения и при помощи метода динамического светорассеяния\*.

Выделить кровь, получить эритроцитарную массу, гемолизаты крови.

Освоить методику определения супероксиддисмутазной активности гемолизатов крови

Освоить методику определения каталазной активности гемолизатов крови

Освоить гемихромный метод определения концентрации гемоглобина.

Инкубация крови с коллоидными растворами серебра и определение модифицированной активности АФ.

Оценить методом ЭПР с использованием спиновых зондов 5 и 16ДС изменение микровязкости мембраны эритроцитов после инкубации их с наночастицами серебра.

#### **Предполагаемые результаты:**

В процессе работы студенты освоят методы получения коллоидных растворов с разным размером наночастиц серебра, получать эритроцитарную массу и гемолизаты крови, определять активности АФ. На примере конкретного исследования смогут выяснить, что может лежать в основе цитотоксических эффектов наночастиц серебра. В частности определяют в экспериментах *in vitro*, как влияют нанобъекты на антиоксидантный статус крови млекопитающих. Получат навыки статистической обработки полученных результатов и подготовки отчета с представлением полученных результатов.

\* В случае, если не выполняется задача “Применение эффекта плазмонного резонанса для исследования свойств мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy) с наночастицами серебра”.

#### **Оценка итогов проведенного практикума**

По окончании прохождения практикума студенты пишут самостоятельный отчет по задаче с описанием полученных результатов. Отчет студенты сдают на проверку руководителю задачи. В установленный срок отчет возвращается студенту с оценкой.

Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

## Задача №6

### «Молекулярно-механическое моделирование свойств углеродных нанотрубок»

Зленко Д.В., Мамонов П.А.

#### Аннотация

В рамках данной задачи студенты получают практические навыки создания и настройки молекулярно-механических моделей, осваивают методы молекулярного моделирования. В качестве объекта моделирования используются углеродные нанотрубки различного строения. В ходе работы студенты исследуют их механические колебательные свойства, упругие свойства, а также проницаемость нанотрубок для молекул воды. При решении этих задач студенты осваивают методы гармонического анализа, управляемой и обычной молекулярной динамики, знакомятся с техникой интерпретации результатов молекулярного моделирования. Перечисленный комплекс работ позволяет дать студентам минимальный базовый уровень владения методами молекулярного моделирования, а также познакомить с интересными и необычными свойствами углеродных нанотрубок.

#### Введение

На сегодняшний день методы молекулярного моделирования стали незаменимым инструментом исследования биологических молекул и наноструктур. Совершенствование теоретических подходов и развитие вычислительной техники позволило им приблизиться по информативности к экспериментальным методам исследования. Вместе с тем подходы основанные на моделировании обладают рядом преимуществ перед экспериментальными методами. Исследование свойств молекулярных систем «*in silico*» не требует специализированного экспериментального оборудования и позволяет в короткие сроки решать задачи, требующие значительного времени и средств при исследовании в реальном эксперименте. Несмотря на то, что в общем случае точность результатов, получаемых при моделировании, уступает экспериментальным, подобный подход находит применение в ситуации, когда стоит задача массового тестирования свойств большого количества соединений. Например, таким образом тестируется сродство потенциальных лигандов к белку-мишени, при создании новых лекарств. Другим преимуществом подхода основанного на моделировании является возможность более глубокого анализа процессов происходящих в молекулярной системе. Более того, в таких сложных системах, как биополимеры и их комплексы, а также наноструктуры, интерпретация результатов реальных экспериментов часто оказывается затруднительной без привлечения результатов

численного моделирования. Одной из таких задач является, например, исследование структурно-функциональных взаимосвязей в белках, и в частности механизмов конформационной регуляции их активности. Наконец, подходы основанные на моделировании позволяют исследовать свойства еще не созданных, гипотетических био- и наноструктур, что может привести к созданию новых материалов и наноустройств.

Одним из широко применяемых подходов к моделированию молекулярных систем, знакомству с которым посвящен данный практикум, является молекулярно-механический подход. В основе этого подхода лежит представление об атомах, как о классических точечных взаимодействующих частицах. Взаимодействие между этими частицами описывается набором эмпирических потенциалов, именуемых «силовым полем». Наиболее часто применяемый для моделированию молекулярных систем метод состоит в расчете динамики молекулярно-механической системы в рамках классической механики, с последующим анализом полученных траекторий движения атомов. Такой подход обладает высокой информативностью, позволяя описывать большинство процессов, происходящих в молекулярной системе и не сопровождающихся разрывом/образованием ковалентных связей и изменением электронного состояния системы. Важным преимуществом молекулярно-механического моделирования является относительно низкая ресурсоемкость соответствующих вычислительных процедур, что позволяет рассчитывать динамику систем включающих сотни тысяч атомов на временах до десятков наносекунд.

В качестве объекта исследования в практикуме используются нанотрубки различного строения. Нанотрубки являются классическим нанообъектом и представляют интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения. Данный практикум посвящен исследованию механических свойств нанотрубок и их проницаемости для молекул воды.

Первой задачей, решаемой в рамках практикума, является исследование спектра нормальных колебаний изолированной нанотрубки. Данная задача призвана продемонстрировать то промежуточное положение между макрообъектами и молекулярными системами, которое занимают нанообъекты. Так, будучи одиночной молекулой, нанотрубка демонстрирует свойства присущие механическим макросистемам: в колебательном спектре отдельной нанотрубки присутствуют колебания, аналогичные колебаниям струны, деформации сжатия-растяжения и изгибной деформации упругой балки.

Следующая задача практикума состоит в определении модуля упругости сжатия отдельной нанотрубки. С этой целью выполняется расчет управляемой молекулярной динамики нанотрубки при действии на нее растягивающей силы до достижения системой состояния равновесия. По изменению длины нанотрубки и значению приложенной силы

рассчитывается модуль Юнга. Также рассчитывается модуль упругости материала на основе нанотрубок с учетом плотности их упаковки. Результаты полученные на данном этапе демонстрируют более высокие прочностные характеристики нанотрубок по сравнению с известными конструкционными материалами.

Заключительная часть практикума посвящена моделированию латеральной проводимости нанотрубок для воды. С этой целью выполняется расчет молекулярной динамики нанотрубок в воде и вычисляются коэффициенты диффузии молекул воды в полости нанотрубки и в объеме воды. Результаты моделирования свидетельствуют о высокой проводимости нанотрубок для воды. Способность нанотрубок к латеральной проводимости веществ считается практически важным свойством, которое может быть использовано для организации трансмембранной проницаемости липидных мембран, при решении ряда медико-биологических проблем.

#### Цель и задачи

Основной целью данного практикума является обучение студентов принципам создания молекулярно-механических моделей, подбору параметров проведения молекулярных расчетов, а также основным приемам моделирования молекулярных систем и обработки полученных массивов данных.

В ходе выполнения практикума студенты решают следующие задачи:

8. Создание молекулярно-механических моделей углеродных нанотрубок различного строения.
9. Оптимизация геометрии молекулярных моделей нанотрубок.
10. Расчет и анализ спектра нормальных колебаний нанотрубок.
11. Расчет модуля упругости нанотрубки при растяжении, с использованием метода управляемой молекулярной динамики.
12. Расчет коэффициента диффузии воды внутри нанотрубки и в растворе с использованием метода молекулярной динамики.

#### Объекты и методы

В качестве объекта исследований в задаче используются углеродные нанотрубки различного строения. Моделирование осуществляется в рамках молекулярно-механического подхода. Для моделирования используется свободно распространяемый пакет программ GROMACS [<http://www.gromacs.org/>]. Для создания, редактирования и визуализации молекулярных систем используется программа PyMOL. Непосредственно

для создания нанотрубок и визуализации нормальных колебаний используются программные модули PyMOL `ntgen.py` и `nmgen.py`, доступные на сайте <http://erg.biophys.msu.ru/>. В качестве среды для технических расчетов используется интерактивная командная среда IPython [<http://ipython.scipy.org/>], являющаяся интерфейсом интерпретатора языка Python [<http://www.python.org/>]. В сочетании с библиотеками численных алгоритмов SciPy [<http://www.scipy.org/>] и графики matplotlib [<http://matplotlib.sourceforge.net/>] данное ПО является мощным и удобным пакетом для численного анализа.

### **Требования к отчету**

В конце практикума студенты готовят письменный отчет по задаче. Отчет должен включать следующие разделы:

1. Введение, включающее краткую характеристику метода молекулярной динамики, а также характеристика объекта исследования - нанотрубок, их структуры, свойств и возможных путей их практического использования.
2. Цель и основные задачи данного практикума.
3. Описание хода выполнения задачи, состоящее из трех частей, посвященных трем разделам задачи. Каждая часть должна начинаться с постановки задачи и краткого описания используемых для ее решения подходов. Затем должно следовать собственно описание хода работы, снабженное промежуточными числовыми результатами и иллюстрациями. В заключении приводятся финальные результаты моделирования, со всеми необходимыми выкладками, сравниваются и интерпретируются результаты моделирования для нанотрубок различного строения.
4. Заключение, в котором кратко формулируются полученные результаты и дается сравнительная характеристика нанотрубок различного строения.

## **Задача №7**

### **«Определение эффективности индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET), фёрстеровского радиуса и константы скорости переноса энергии от квантовых точек к биологическим акцепторам»**

**Максимов Е.Г.**

#### **Аннотация задачи**

Задача предлагает комплексное исследование фотофизических свойств квантовых точек и освоение ряда методов нанобиотехнологий и клеточной биофизики. Выполнение данной задачи возможно не только в рамках цикла, но и как самостоятельной задачи практикумов по нанобиотехнологиям, клеточной биофизики и спектроскопическим методам.

Современные нанотехнологии позволяют синтезировать полупроводниковые CdSe/ZnS нанокристаллы, или так называемые квантовые точки (КТ), которые поглощают свет в широком оптическом диапазоне от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области. Спектр флуоресценции КТ достаточно узок (полуширина спектра составляет 20—25 нм), идеально симметричен, а положение максимума испускания флуоресценции определяется диаметром нанокристалла. Несколько уступая лучшим флуоресцентным меткам в величине квантового выхода флуоресценции (~70 % при комнатной температуре), квантовые точки превосходят их на несколько порядков по величине сечения поглощения света. Яркость свечения нанокристаллов настолько высока, что их можно визуализировать как единичные объекты с помощью обычного флуоресцентного микроскопа. Это стало причиной широкого применения квантовых точек в качестве флуоресцентных зондов. Покрытие нанокристаллов органической оболочкой из би- или трифункциональных полимеров обеспечивает их растворимость в воде за счет поверхностных полярных групп. Функциональные группы органической оболочки, доступные для конъюгации, делают возможным создание искусственных светособирающих комплексов на основе квантовых точек, которые могут служить высокоэффективными донорами энергии для фотосинтетических пигмен-белковых комплексов. Вышеперечисленные свойства делают квантовые точки удобным объектом для исследования процессов переноса энергии.

**Цель задачи:** освоить методики регистрации спектров поглощения и флуоресценции, а также основные методы определения квантового выхода флуоресценции зондов; освоить программу Photochemcad 2.1 и расчеты константы скорости миграции энергии, эффективности FRET, интеграла спектрального перекрытия и фёрстеровский радиус в донорно-акцепторной паре.

**Объекты исследования:** биологическая макромолекула/пигмент-белковый комплекс на выбор, полупроводниковые квантовые точки (CdSe/ZnS или CdTe в зависимости от фотофизических свойств биологического объекта).

**Методы:** абсорбционная спектроскопия, спектрофлуориметрия, метод счета фотонов для регистрации кинетик затухания флуоресценции.

**План выполнения работы:**

1. Выбор донорно-акцепторной пары для проведения исследования.
2. Регистрация спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора.
3. Анализ спектров поглощения и флуоресценции донора и акцептора, определение квантового выхода донора.
4. Регистрация кинетики затухания флуоресценции донора методом счета фотонов, определение времени жизни возбужденного состояния.
5. Анализ эффективности миграции энергии в донорно-акцепторной паре с помощью программы Photochemcad 2.1.

**Предполагаемые результаты и навыки:**

- Освоение методов абсорбционной спектроскопии, спектрофлуориметрии, счета фотонов для регистрации кинетик затухания флуоресценции;
- Приобретение навыков анализа спектров поглощения и флуоресценции, а также расчета квантовых выходов флуоресцентных зондов;
- Освоение программы Photochemcad 2.1. и проведение квантово-механических расчетов: эффективность перекрытия спектров, эффективность миграции энергии и соответствующих констант.
- Полученные результаты продемонстрируют зависимость эффективности миграции энергии от донора к акцептору от их спектральных свойств. Задача ознакомит нанотехнологов, физиков и химиков с особенностями применения наночастиц в спектроскопии и оптических методах для исследования свойств живых клеток, а

биологов — с возможностью получать дополнительную информацию о структуре и свойствах биомолекул при использовании квантовых точек.

**Оценка итогов проведенного практикума:** основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

1. краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием преимуществ квантовых точек по сравнению с органическими флуоресцентными зондами;
2. четко сформулированные цели и задачи исследования;
3. основные методы исследования;
4. корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;
5. четкие выводы по полученным результатам;
6. список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами зачет, в ходе которого студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным за практикум.

**Задача №8**  
**«Современные методы моделирования белок-белковых взаимодействий»**

**Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Ризниченко Г.Ю.**

**Аннотация задачи**

Методы компьютерного моделирования находят широкое применение для моделирования наноструктур. В данной работе предлагается освоить метод многочастичной броуновской динамики на примере моделирования связывания белков электрон-транспортной цепи фотосинтеза.

Поведение частиц нано-размера в ансамбле отличается от поведения отдельных атомов и от поведения макротел. В предлагаемой модели описывается взаимодействие сотен частиц, учитываются электростатические взаимодействия, форма частиц и реакционного пространства. Частицы рассматриваются как твердые тела, для описания их движения используется уравнение Ланжевена, для расчета электростатического потенциала - уравнения Пуассона-Больцмана.

Метод много частичной броуновской динамики позволяет изучать влияние формы частиц, их количества, распределения зарядов на частицах, формы реакционного пространства на процесс связывания частиц.

**Цель работы:** освоение метода и изучение возможностей многочастичной броуновской динамики в применении к описанию кинетики связывания белков.

**Объекты исследования:** PDB структуры белков пластоцианина и цитохрома f.

**Методы:** многочастичная броуновская динамика.

**План работы:**

1. Изучение основ метода многочастичной броуновской динамики.
2. Нахождение структуры белков пластоцианина и цитохрома f в базе данных PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)).
3. Ручная обработка загруженного файла с целью получения отдельного PDB-файла для каждого белка.
4. Расчет эллипсоидов вращения для молекул белков в пакете MatLab\*.
5. Визуализация трехмерной структуры белков.
6. Расчет зарядов на аминокислотных остатках.

7. Формирование конфигурационного файла для расчета кинетики в программе ProKS.
8. Визуализация молекул белков и эквипотенциальных поверхностей в пакете MatLab.
9. Моделирование кинетики взаимодействия белков в программе ProKS при разных значениях параметра вероятности докинга  $p$ .
10. Построение кинетических кривых реакции белков в пакете Origin. Фитинг полученных кривых.
11. Нахождение констант скорости второго порядка реакции в единицах  $M^{-1}c^{-1}$ .
12. Написание отчета.

**Предполагаемые результаты и навыки:**

- Освоение метода многочастичной броуновской динамики в применении к описанию кинетики образования белок-белковых комплексов.
- Приобретение навыков визуализации трехмерной структуры белков и электростатического потенциала, анализа кинетических кривых.
- Данная задача продемонстрирует студентам возможность использования метода многочастичной броуновской динамики для изучения процесса связывания белков.

**Отчет по задаче должен содержать:**

1. Краткое теоретическое введение в задачу и метод исследования.
2. Цели и задачи исследования.
3. ID PDB-файла комплекса пластоцианина и цитохрома  $f$ .
4. Рисунки молекул белков и потенциальных поверхностей. Качественное описание электрического поля белков.
5. Пример кинетической кривой и ее аппроксимации.
6. Таблица с полученными значениями кинетических констант при различных значениях вероятности докинга  $p$ . Анализ полученных результатов и выбор подходящих значений параметров.
7. Выводы.

## Задача №9

### «Проникновение метилвиологена в растительную клетку под действием возбуждения, вызванного электрическим стимулом»

Крупенина Н.А.

Метилвиологен (МВ, N,N'-диметил-4,4'-дипиридин дихлорид) — это гербицид, известный также под названием паракват, который широко используется в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками во многих странах мира. Губительное действие МВ на растения объясняется тем, что МВ, попадая в хлоропласты, принимает электроны от Fe-S центров на акцепторной стороне фотосистемы I и приводит к образованию радикальных форм кислорода. В растворе МВ находится в виде двухвалентно заряженных молекул, линейные размеры которых составляют около  $0.6 \times 1.2$  нм. В настоящее время не до конца понятно, каким образом МВ попадает в хлоропласты, преодолевая мембранные барьеры клетки (плазмалемма и оболочка хлоропласта). Для исследования этой проблемы удобно использовать важное свойство растений — способность генерировать потенциал действия (ПД) в ответ на различные стимулы. Имеются данные, что ПД резко ускоряет проникновение МВ в хлоропласты нативной клетки.

**Цель задачи:** Изучить влияние потенциала действия (ПД) на фотохимическую эффективность фотосистемы II, а также pH у поверхности растительных клеток, обработанных метилвиологеном.

**Объект исследования:** клетки харовой водоросли *Chara corallina*

**Методы:** Измерение флуоресценции хлорофилла методом импульсно-модулированной флуориметрии (Microscopy FAM); измерение pH у поверхности клетки с помощью сурьмяного микроэлектрода в стеклянной изоляции.

**Предполагаемые результаты и навыки:** Предполагается освоение студентами предложенных методов. Планируется показать, что ПД, вызванный одиночным электрическим стимулом, облегчает проникновение МВ в хлоропласты растительной клетки и переключает фотосинтетический (НАДН-зависимый) поток электронов на восстановление кислорода, опосредованное этим экзогенным акцептором. Предлагается также обсудить возможный механизм проникновения молекул МВ к хлоропластам клетки *Chara*.

**Организация задачи практикума:**

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя. Местом проведения является лаборатория

кафедры биофизики биологического факультета МГУ (группа биоэлектрохимии).

### **Экспериментальная часть**

Ознакомление с методами работы и объектом исследования.

Приготовление необходимых растворов:

- Искусственная прудовая вода (ИПВ) с нормальным содержанием  $\text{CaCl}_2$ : 0.1 мМ  $\text{KCl}$ , 1 мМ  $\text{NaCl}$ , 0.1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{pH} = 7$ .

- Искусственная прудовая вода (ИПВ) с повышенным содержанием  $\text{CaCl}_2$ : 0.1 мМ  $\text{KCl}$ , 1 мМ  $\text{NaCl}$ , 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ ;  $\text{pH} = 7$ .

- Метилвиологен (концентрация 0.1 мМ).

- Изучение влияния ПД на эффективный квантовый выход фотохимической активности фотосистемы II, флуоресценцию хлорофилла, нефотохимическое тушение флуоресценции и  $\text{pH}$  у поверхности клетки *Chara* в контрольных условиях и в присутствии в среде МВ (измерения проводят в одной из зон клетки — в кислой или щелочной):
  1. В среде с нормальным (0.1 мМ) содержанием  $\text{CaCl}_2$ , без МВ (контроль 1);
  2. В среде с повышенным (2 мМ) содержанием  $\text{CaCl}_2$ , без МВ (контроль 2);
  3. В среде с повышенным (2 мМ) содержанием  $\text{CaCl}_2$  и 0.1 мМ МВ;
  4. В среде с нормальным (0.1 мМ) содержанием  $\text{CaCl}_2$  и 0.1 мМ МВ.

Если позволяет время, можно провести аналогичные эксперименты в другой зоне клетки.

- Обработка полученных результатов, построение графиков, обсуждение результатов.
- Написание отчета.

## Задача №10

### «Диссипативные структуры в реакции Белоусова-Жаботинского с реагентами, диспергированными в обращенной АОТ микроэмульсии»

Ванаг В.К. и Черкашин А.А.

#### Аннотация

Диссипативные структуры<sup>18</sup> (ДС) играют важную роль во многих биологических процессах (морфогенез, динамика популяций и др.), и поэтому представляют большой теоретический интерес. Особую роль в исследовании ДС играет широко известная реакция Белоусова-Жаботинского (БЖ). Если реагенты БЖ-реакции заключить в нанокapли (размером 2-100 нм) водной фазы, диспергированной в органической фазе (октан) при участии поверхностно-активного вещества (АОТ), количество разных типов ДС, возникающих в такой системе, возрастает многократно. Помимо различных типов волн, наблюдаются стационарные (и даже колебательные) структуры Тьюринга, локализованные структуры и хаотические режимы. Важным условием появления такого разнообразия структур является размер и концентрация медленно диффундирующих в октане (по сравнению с быстро диффундирующими неполярными интремедиатами) нанокapелек водной фазы. Переходами между различными структурами можно управлять (к примеру, температурой реактора).

В качестве катализатора можно использовать различные соединения ионов металлов переменной валентности (ферроин, батофенантролин,  $Ru(bpy)_3$ ). В БЖ-АОТ системе, катализируемой батофенантролином, наблюдается принципиально новый класс концентрационных волн, прыгающие волны (JW). Эти волны распространяются в пространстве дискретными скачками. В этом классе выделяют три подтипа волн: непосредственно прыгающие волны (JW), волны пузырьков (BW) и вращающиеся волны (RW). Все они распространяются в пространстве прыжками (длина прыжка в наших опытах составляла 100 – 250 мкм). Переходом от обычных распространяющихся непрерывно и равномерно триггерных волн к прыгающим волнам можно управлять температурой. При высоких температурах (40-50 °C) RW, JW и BW превращаются в хаотические волны.

В БЖ-АОТ системе, катализируемой металлокомплексом  $Ru(bpy)_3$ , наблюдается переход от стационарных структур Тьюринга (при 15 – 25 °C) к волнам и хаотическим волнам (при 50 °C) при температурно-индуцированном перколяционном переходе. При промежуточных температурах найдены новые ДС: “колебательный Тьюринг” (при 35 – 40 °C) и “обращенный колебательный Тьюринг” (при 45 – 50 °C). В отличие от стационарных

структур Тьюринга, периодически распределенные в пространстве концентрационные пики колеблются во времени с определенным периодом и в отличие от стоячих волн эти пики-максимумы не меняют свое положение в пространстве (для стоячих волн характерно постоянное положение узлов, но не пиков). Для структур “обращенный колебательный Тьюринг” характерно колебание минимумов.

#### **Цель задачи:**

Исследовать различные типы диссипативных структур в БЖ-АОТ системе в зависимости от размера нанокapель водной фазы и переходы между структурами, вызванные внешними воздействиями (изменение температуры, освещение и др.).

#### **Объекты исследований:**

Микроэмульсии АОТ, нагруженные реагентами БЖ-реакции. В качестве катализаторов используются ферроин, батофенантролин и  $Ru(bpy)_3$ .

#### **Методы:**

Диссипативные структуры, образующиеся в тонком слое микроэмульсии наблюдают через микроскоп и регистрируют при помощи видеокамеры. Размер нанокapель и их распределение оценивают по динамическому светорассеянию. Перколяционный переход в микроэмульсии можно зарегистрировать по изменению проводимости. Для обработки результатов используют методы компьютерного анализа изображений.

#### **План работы:**

1. Приготовить две микроэмульсии (I и II), которые при смешивании между собой и разбавлении октаном дают рабочую микроэмульсию с заданными параметрами.
2. Приготовить рабочую микроэмульсию с компонентами БЖ реакции в водной фазе. Заполнить и собрать реактор для наблюдения и регистрации ДС.
3. При помощи видеомикроскопа записать возникающие ДС, их смену во времени.
4. По указанию преподавателя повторить опыт при изменении параметров проведения реакции (температура, параметры микроэмульсии, различные катализаторы).
5. Проанализировать полученные видеозаписи ДС для получения основных параметров структур.

#### **Предполагаемые результаты:**

1. Освоение методики приготовления обращенной АОТ микроэмульсии с реагентами БЖ реакции;
2. Наблюдение и видеозапись ДС в БЖ-АОТ системе;

3. Определение параметров ДС в БЖ-АОТ системе при помощи анализа изображений; Полученные результаты позволяют познакомиться с различными ДС, возникающими в БЖ-АОТ системе в зависимости от размера и распределения наночапель с реагентами, которыми, в свою очередь, можно управлять при помощи внешних воздействий (температура, свет, и др.).

#### **Оценка итогов проведенного практикума:**

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

1. краткое теоретическое введение с описанием исследуемой реакции;
2. четко сформулированные цели и задачи исследования;
3. описание методов исследования;
4. обработанные (построить зависимости интенсивности вдоль заданной линии от времени, 2D Фурье преобразования для структур Тьюринга, рассчитать значения характерных размеров структур и скоростей распространения волн) и результаты проведенных экспериментов обсуждение полученных результатов;
5. выводы по полученным результатам.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами беседу, в ходе которой студенты демонстрируют свой уровень освоения материала. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и ответственным по практикуму на зачете.

#### **Организация задачи практикума:**

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

## Задача № 11

### «Влияние наноматериалов на функционирование миелиновых нервных волокон»

Браже А.Р.

#### Аннотация

Препарат седалищных нервов лягушки и отдельных миелинизированных нервных волокон представляет собой удобную тестовую систему. С одной стороны, он относительно стабилен и прост в приготовлении, а с другой — позволяет выявить влияние различных агентов на работоспособность нервной ткани. Наиболее чувствительным элементом миелинизированных нервных волокон является паранодально-нодальный комплекс, т.е. перехват Ранвье, окружающие его ламеллы шванновских клеток и близлежащие области, образующие плотный контакт мембран шванновской клетки с мембрано аксона. Ряд внешних факторов может приводить к патологическому состоянию т.н. фокальной демиелинизации, которая сопровождается нарушением архитектуры паранодально-нодального комплекса и потерей способности к нормальному проведению нервных импульсов.

Работа нервных волокон в режиме проведения ритмического возбуждения сопровождается относительно медленными метаболическими процессами. Важным маркером таких процессов является перераспределение мембранносвязанного Са.

#### Цели работы

Исследовать влияние коллоидных наночастиц серебра, и/или других наночастиц на

1. порог возбуждения
2. форму потенциалов действия
3. устойчивость при проведении ритмического возбуждения
4. изменение содержания мембранносвязанного Са на фоне ритмической активности

#### Методическая часть

##### Объект исследований

Работа проводится на цельных седалищных нервах травяной лягушки *Rana temporaria* и изолированных нервных волокнах.

##### Методы исследования

Проводится экстраклеточная регистрация потенциалов действия в режимах проведения одиночных потенциалов действия и ритмического возбуждения. В случае отведения от цельного нерва используются металлические макроэлектроды, в случае отведения от изолированных нервных волокон — втягивающие микроэлектроды (suction microelectrodes).

Изменения в уровне мембранносвязанного Са проводят с помощью зондовой флуоресцентной микроскопии.

### **Ход работы**

#### **Приготовление препаратов**

Разрушив ЦНС лягушки при помощи зонда приготовить препарат седалищных нервов лягушки. Для одного из нервов приготовить препарат одиночных нервных волокон, разрушая соединительно-тканую оболочку нерва и разделяя отдельные волокна при помощи тонкого стеклянного капилляра.

#### **Регистрация потенциалов действия**

Далее проводят регистрацию составных потенциалов действия в контроле и при добавлении наночастиц. Определяют основные параметры возбуждения: порог, реобазу, хронаксию, исследуют форму потенциалов действия.

#### **Изменения содержания мембранносвязанного Са**

С использованием зонда хлортетрациклина наблюдают динамику уровня мембранносвязанного Са на фоне ритмического возбуждения в норме и при внесении наночастиц.

#### **Предполагаемые результаты**

По выполнении данной практической программы обучающиеся приобретут навыки работы с препаратами нервных волокон, оценки их функционального состояния и с помощью данной тестовой системы смогут оценивать уровень токсичности наноматериалов для нервной ткани.

## Задача № 12

### «Исследование фотодинамического действия наночастиц сенсibilизаторов разных типов на микроорганизмы»

Шумарина А.О., Страховская М.Г.

#### Аннотация

Фотодинамические процессы, которые запускаются светом, активирующим хромофор-фотосенсибилизатор, генерирующий цитотоксичные формы кислорода, представляют значительный интерес как с точки зрения фундаментальных исследований их механизмов, так и в связи с их прикладной ролью в медицине, где они используются для лечения опухолевых и микробных заболеваний.

Значительное число трудноизлечимых микробных инфекций вызвано грам-отрицательными бактериями (синегнойная палочка, акинетобактер, возбудители желудочно-кишечных заболеваний – хеликобактер, сальмонелла, кишечная палочка и др.), чья устойчивость к различным внешним агентам (антибиотикам, детергентам, красителям) в значительной степени обусловлена наличием отрицательно заряженной наружной плазматической мембраны, которая представляет собой эффективный барьер проницаемости для гидрофобных и анионных молекул.

В связи с этим, для достижения наибольшей эффективности терапевтического действия необходимы разработка и синтез наночастиц фотосенсибилизатора с заданными спектральными и физико-химическими свойствами.

Так, одним из перспективных подходов к сенсibilизации грам-отрицательных бактерий является их обработка с помощью заряженных поликатионных наноструктур (с размерами около 3 x 3 нм), содержащих центральное ядро – цитотоксичный фотосенсибилизатор и вспомогательные положительно заряженные группы. Присутствие последних обеспечивает высвобождение липополисахаридов, дезинтеграцию наружной мембраны и увеличение ее проницаемости, а также электростатическое взаимодействие с клеточной стенкой бактерий, что повышает избирательность действия антимикробного препарата за счет его адресной доставки к клеткам-мишеням. Актуальность развития этого направления ФДТ связана с проблемами при проведении традиционной терапии инфекционных заболеваний: распространением патогенных штаммов микроорганизмов с множественной устойчивостью к антибиотикам, побочными эффектами при проведении системного лечения антимикробными препаратами. Преимущество метода ФДТ при лечении микробных поражений определяется возможностью избирательного накопления фотосенсибилизатора клетками патогенов и локальностью светового воздействия (в том числе за счет применения световолоконной оптики и эндоскопической техники). Кроме того, неспецифичность фотодинамического действия практически исключает развитие

микробной устойчивости к ФДТ.

В настоящее время показана возможность применения ФДТ для лечения микозов, раневых инфекций, трофических язв, язвенной болезни желудка (в патогенезе которой основная роль принадлежит грамм-отрицательной бактерии *Helicobacter pylori*) и других инфекционных заболеваний.

Основные мишени фотодинамической инактивации бактериальных клеток - ДНК и цитоплазматическая мембрана. Предполагается, что фотоокислительная деструкция ДНК (преимущественно за счет окисления гуанозина), имеющая место при действии многих фотосенсибилизаторов, не является главной причиной гибели бактериальной клетки, тогда как цитоплазматическая мембрана может быть критической клеточной мишенью: ее необратимое повреждение приводит к вытеканию внутриклеточного содержимого, инактивации ферментов и транспортных систем, а также нарушению синтеза клеточной стенки.

### **Цель работы:**

Исследовать сравнительную эффективность действия различных фотосенсибилизаторов на клетки дрожжей и грамм-отрицательных бактерий.

### **Задачи:**

1. Исследовать сравнительную эффективность инактивации клеток дрожжей фотосенсибилизаторами разных типов;
2. Исследовать сравнительную эффективность инактивации грамм-отрицательных бактерий фотосенсибилизаторами разных типов;
3. Исследовать влияние одновалентных и двухвалентных солей на эффективность фотодинамического действия положительно заряженного фотосенсибилизатора.

### **Материалы и методы:**

**Объекты исследования:** Биосенсор "Эколюм" - лиофилизированный генно-инженерный штамм *E.coli pXen7* (рис. 4);

штамм дрожжей *Candida guilliermondii* ВСБ-656 (культура получена во ВНИИсинтезбелок, Москва).

### **Фотосенсибилизаторы:**

октакис-(холинил)замещенный фталоцианин цинка ( $ZnPcChol^{8+}$ ) – Холосенс; анионные тетраакис-(сульфо)замещенный фталоцианин алюминия ( $AlPc^{4-}$ ) - Фотосенс; метиленовый

синий; профлавин ацетат; бенгальский розовый (красители синтезированы в ФГУП ГНЦ «НИОПИК»).

**Люминометр** “Биотокс-6” (Москва) с набором кювет объемом 1,5 мл для измерения интенсивности биолюминесценции биосенсора "Эколюм". Принцип действия прибора основан на регистрации слабых световых потоков с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), работающего в режиме счета анодных импульсов. Область максимальной спектральной чувствительности ФЭУ располагается в диапазоне 380-490 нм.

#### **Обработка результатов:**

По результатам исследования фотодинамического действия различных фотосенсибилизаторов на клетки бактерий и дрожжей: построить графики зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий и выживаемости дрожжей ( $1 - T_{\phi}$ ) от дозы света  $D$ . Доза света определяется по формуле  $D(\text{Дж}/\text{см}^2) = I(\text{Вт}/\text{см}^2) * t(\text{сек})$ , где  $D$  – доза света,  $I$  – интенсивность света,  $t$  – время облучения. Определить параметр  $D_{50}$  – дозу света, при которой достигается 50%-ое снижение интенсивности биолюминесценции бактерий или выживаемости дрожжей. Вычислить фоточувствительность  $\Phi\text{Ч}_{50}$  как величину обратную  $D_{50}$ . Сравнить значения фоточувствительности для разных фотосенсибилизаторов.

По результатам исследования влияния солей на эффективность фотодинамического действия Холосенса: построить графики зависимости интенсивности биолюминесценции бактерий и выживаемости дрожжей ( $1 - T_{\phi}$ ) от дозы света  $D$ . Для фиксированной дозы света определить параметр  $K$ :

$$K = (1 - T_{\phi})_{\text{соль}} / (1 - T_{\phi}), \text{ где}$$

$(1 - T_{\phi})_{\text{соль}}$  - интенсивность биолюминесценции бактерий или выживаемость дрожжей для пробы, содержащей Холосенс и соль,

$(1 - T_{\phi})$  - интенсивность биолюминесценции бактерий или выживаемость дрожжей для пробы, содержащей только Холосенс.

## Задача № 13

### «Транспорт неэлектролитов через природные мембранные нанопоры»

Локтюшкин Алексей Владимирович

#### АННОТАЦИЯ

Транспорт молекул различных веществ через наноразмерные поры – важный этап многих биологических и технологических процессов. В биологических системах одним из важнейших транспортных процессов является перенос воды через клеточные липидные мембраны. Транспорт воды через некоторые клеточные мембраны протекает с очень высокой скоростью, кроме того, эта скорость может существенно изменяться в зависимости от физиологического состояния клетки. Высокоэффективный и регулируемый перенос воды через мембраны осуществляют специализированные интегральные мембранные белки аквапорины.

Простой моделью функционирования аквапоринов можно считать транспорт воды в углеродных нанотрубках – одном из важнейших объектов нанотехнологии. Несмотря на то, что поверхность нанотрубки гидрофобна, молекулы воды быстро заполняют её внутренний объем. Внутри трубки молекулы воды экранированы от конкурентных взаимодействий, что способствует образованию между ними долгоживущих водородных связей. При наличии между концами трубки разности химического потенциала воды, её молекулы могут синхронно перемещаться вдоль оси канала. Оказалось, что скорость этого потока исключительно высока благодаря слабому взаимодействию воды и гидрофобной поверхности нанотрубки.

Аквапорины – это семейство интегральных мембранных белков, формирующих поры, через которые проникает вода и ряд других низкомолекулярных неэлектролитов. Белки этого семейства очень широко распространены в живой природе – к настоящему времени обнаружено более 450 различных аквапоринов у представителей всех царств живых организмов от архей до животных. Сходство процессов переноса воды через углеродные нанотрубки и аквапорины обусловлено в первую очередь тем, что водный канал аквапоринов имеет преимущественно гидрофобные свойства.

Первый представитель семейства аквапоринов AQP1 был выделен в 1988 г. из мембраны эритроцитов человека. Наличие именно этого белка обуславливает весьма высокую водную проницаемость мембраны этих клеток. К настоящему моменту показано, что в эритроцитах имеется еще один представитель аквапоринов AQP3. Этот мембранный белок проницаем не только для воды, но и для глицерола.

Проницаемость клеточных мембран для воды и некоторых других незаряженных молекул можно определить, исходя из кинетической кривой изменения объема клетки, помещенной в среду соответствующего состава. В данной задаче этот подход используется для определения коэффициентов проницаемости для воды и глицерола мембраны эритроцитов.

**Цель работы:** исследовать влияние различных факторов (ингибиторов аквапоринов, величины рН) на проницаемость мембраны эритроцитов для воды и глицерола с помощью метода остановленной струи с фотометрической регистрацией.

**Объект исследования:** эритроциты позвоночных животных или человека.

**План работы:**

1. Знакомство с основными принципами и аппаратурой метода остановленной струи. Регистрация кинетической кривой тестовой реакции восстановления 2,6-дихлорофенолиндофенола аскорбиновой кислотой. Определение константы скорости реакции по кинетической кривой.
2. Получение эритроцитарной массы из цельной крови.
3. Регистрация кинетических кривых изменения объема эритроцитов в гипертонической и гипотонической среде (для контрольной суспензии клеток и для суспензии клеток, проинкубированных с ингибитором аквапоринов *лХМБ*). Определение по кинетическим кривым коэффициента осмотической водной проницаемости мембраны.
4. Регистрация кинетических кривых изменения объема эритроцитов в среде, содержащей глицерол (для контрольной суспензии клеток и для суспензии клеток, проинкубированных с ингибитором  $AQP3 NiCl_2$ ). Оценка коэффициента проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола.
5. Получение зависимости проницаемости мембраны эритроцитов для глицерола от величины рН среды.

**Предполагаемые результаты:** в ходе выполнения задачи предполагается освоение студентами основных принципов метода остановленной струи, а также некоторых приёмов анализа данных кинетического эксперимента. Полученные коэффициенты проницаемости для воды и глицерола позволят оценить вклад транспорта через липидный бислой, а также вклад транспорта, опосредованного белками, в суммарную проницаемость мембраны эритроцитов для этих соединений.

**Организация задачи:** задача выполняется группой студентов, состоящей из 2 – 3 человек. Задача проводится в лаборатории Общей биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

## Задача № 14

Осипов В.А., Маторин Д.Н.

### «Изучение токсичности наноматериалов с использованием флуоресценции микроводорослей»

#### Введение

Большинство веществ, входящих в состав промышленных и бытовых стоков, способны оказывать токсическое действие на микроводоросли. В связи с этим водорослевые биотесты входят в число основных при нормировании качества вод: «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов», Минприроды РФ, 2002; «Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris Beijer*)» / Ю.С. Григорьев // ПНД Ф Т 14,1:2:4,10-04, М.2004; «Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей.» ФР.1.39.2007.03223. / Н.С.Жмур, Т.Л. Орлова // М., «Акварос»2007.

В современной практике широко используются стандартизированные методы биотестирования на пресноводных зеленых микроводорослях рода *Chlorella* и *Scenedesmus*, культивируемых по общепринятой методике. Основными показателями токсического действия служат рост и выживаемость культуры. Между тем оценка токсичности вод и в особенности питьевой воды по реакции фотосинтетического биотеста с использованием флуоресценции является чрезвычайно актуальна. Флуориметры позволяют регистрировать параметры флуоресценции хлорофилла культур водорослей для быстрого обнаружения в водной среде токсических веществ. Преимущества использования флуоресценции связаны с быстротой (2 мин), низкой трудоемкостью процесса измерения, а так же с ее высокой чувствительностью к действию токсикантов, поскольку она отражает состояние фотосинтетического аппарата водорослей, являющегося мишенью для многих веществ. Регистрация на свету первичных изменений фотосинтетического аппарата, наиболее чувствительного к повреждающим воздействиям, позволяет сократить время инкубации до 1-3 часов, по сравнению с 1-10 сутками при оценке токсичности по снижению скорости роста. Испытания метода на ряде модельных токсикантов (ионы Cu, Hg, Cd, Cr, Zn, гербициды и др.) показали, что чувствительность его находится на уровне ПДК для этих веществ. С использованием этого метода возможно

проведение исследования детоксицирующих свойств гуминовых веществ различного генезиса по отношению к тяжелым металлам, гербицидам и ПАУ. Методика выполнения измерений обеспечивает выполнение измерений с низкой погрешностью. Учитывая кратковременность экспериментов и предусмотренную методикой возможность жесткого контроля за условиями проведения опытов, разброс измеряемых параметров в повторах относительно низкий.

**Материалы нанотехнологии** уже сегодня получили широкое применение в производстве товаров широкого потребления, технике и медицине. На сегодняшний день насчитывается более 2300 видов продукции с применением наноматериалов и мировое производство интенсивно растет. Наноматериалы используются в производстве пластиков, катализаторов, аккумуляторов и электродов топливных элементов, систем очистки воды, ортопедических имплантов, проводящих покрытий и компонентов электроники. Увеличение производства приведет к увеличению их выброса в окружающую среду. При этом наночастицы и наноматериалы обладают комплексом физических, химических свойств и биологическим действием, которые часто радикально отличаются от свойств этого же вещества в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий.

Поэтому, чрезвычайно важным является оценка экологических последствий их влияния на экосистемы. Это отражено в специальных постановлениях, утвержденных Гл.санврачем РФ -«Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека.» МР 1.2.2522-09, М, 2009 г. ; «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов. Методические указания» МУ 1.2.2520-09 М., 2009 г.

Применение флуоресценции водорослей в качестве биосенсоров, по-видимому, может быть с успехом использовано для тестирования наноматериалов. В последнее время появилось несколько работ по влиянию наночастиц на водоросли. Многие наночастицы делаются с содержанием различных металлов, в том числе и тяжелых металлов. Соли тяжелых металлов занимают особое положение среди загрязнений внешней среды, что связано с их высокой токсичностью, способностью накапливаться в организмах и передаваться по трофической цепи. Тяжелые металлы, попадая в водоемы, оказывают токсическое действие на фитопланктон, который является первичным звеном в системе пищевых связей водных организмов и определяет состояние водной экосистемы в целом. Среди метаболических процессов внутри растительной клетки наиболее чувствительным к действию тяжелых металлов является фотосинтез. Исследования показывают, что по флуоресценции водорослей возможно обнаруживать разные

токсичные загрязнители и, особенно, соли тяжелых металлов, при достаточно низких концентрациях. Соответственно, этот подход, может быть легко использован для наноматериалов, содержащих металлы.

**Цель данной задачи** – освоение методов флуоресцентного анализа на примере исследования токсического действия наноматериалов (наночастиц серебра) на микроводоросли с использованием метода регистрации световых и индукционных параметров флуоресценции хлорофилла.

**Объекты исследования:** В экспериментах используются культуры пресноводных одноклеточных зеленых водорослей *Chlorella pyrenoidosa* и *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Методы:** флуоресцентные методы анализа состояния фотосинтетических организмов (световые кривые и индукционные кривые флуоресценции (**JIP-тест**)).

#### **План работы:**

1) Установка рабочей концентрации водорослей в суспензии по сигналу  $F_t$  для работы в оптимальном диапазоне чувствительности приборов. Определение отношения  $F_v/F_m$  для контрольного образца для подтверждения его высокой фотосинтетической активности.

2) Разлить суспензию водорослей в колбы объемом 50 мл. Одну колбу оставить в качестве контрольного образца. В другие колбы добавить исследуемые наночастицы в нужных концентрациях .

3) Провести инкубацию водорослей с наноматериалами в камере для культивирования и измерить параметры флуоресценции через 1, 4, 8 часов и сутки.

4) Записать данные и напечатать черновые рисунки по световым и индукционным кривым с программ для приборов.

5) Построить графики по световым зависимостям параметров флуоресценции ( $F_t$ ,  $F_m'$ , Yield,  $q_N$ , NPQ,  $rETR$ ) и рассчитать параметры световой кривой относительной скорости нециклического электронного транспорта (коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой,  $\alpha$ ), максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи ( $rETR_{max}$ ) и насыщающую интенсивность света ( $E_n$ )).

6) Построить и рассчитать параметры индукционных кривых флуоресценции (расчет по JIP-тесту).

7) Применение различных программных пакетов для обработки полученных результатов.

8) Выводы по проделанной работе;

### **Предполагаемые результаты**

□ Освоение методики приготовления различных концентраций наночастиц серебра, также медицинского препарата «Аргоника», содержащего коллоидное серебро;

□ Освоение методов регистрации параметров флуоресценции микроводорослей на предложенных приборах;

□ Анализ быстрых световых и индукционных кривых флуоресценции водорослей и выявление наиболее информативных показателей;

□ Приобретение навыков проведения экспериментов по биотестированию для характеристики токсичности современных наноматериалов;

□ Результаты, полученные по параметрам флуоресценции продемонстрируют изменения метаболических процессов внутри растительной клетки при действии наночастиц. Задача может ознакомить нанотехнологов, биофизиков, биологов, химиков, гидробиологов и экологов с подходами по оценке токсического действия наноматериалов (на примере наночастиц серебра) на микроводоросли.

### **Оценка итогов проведенного практикума**

Основной формой отчетности студентов является письменный отчет по результатам исследования, который должен включать:

7. Краткое теоретическое введение с описанием исследуемого объекта и указанием преимуществ быстрых флуоресцентных параметров для исследования объекта;

8. Четко сформулированные цели и задачи исследования;

9. Описание основных методов исследования;

10. Корректно обработанные и представленные в удобной для восприятия форме результаты проведенных экспериментов и обсуждение полученных результатов;

11. Четкие выводы по полученным результатам;

12. Список использованной дополнительной литературы.

По представленному отчету преподаватель проводит со студентами устную беседу, в ходе которой студенты отвечают на вопросы по теоретическим основам выполняемой задачи, ходу выполнения работы, результатам и сделанным выводам. В качестве варианта сдачи задачи возможно выполнение студентами устного доклада с презентацией по результатам проделанной работы. Отчет защищается студентом перед преподавателем и

ответственным по практикуму на зачете.

### **Организация задачи практикума**

Задача выполняется группой студентов, состоящей из 2-3 человек. Группа работает под руководством одного преподавателя и выполняет отдельное исследование, которое может производиться как независимо, так и в рамках цикла задач. Местом проведения являются лаборатории кафедры биофизики биологического факультета МГУ.