

Лекция 3. Современные подходы биомедицины и нанобиотехнологии

В третьей лекции будут представлены исследования, связанные с обоснованием внедрения современных методов и подходов биофизики и нанобиотехнологии для решения проблемы регуляции функциональной активности нервной системы за счет изменений эффективности кислород-транспортной функции эритроцитов и синтеза АТФ в митохондриях. Будут представлены примеры применения атомно-силовой, интерференционной и конфокальной микроскопии, а также Раман- и ИК- спектроскопии для контроля за состоянием липидов миелина нервного волокна, цитохромов митохондрий и конформации гемоглобина эритроцита.

Классификация заболеваний

Болезни, вызванные возбудителями
(бактерии, вирусы, простейшие, грибы, черви)

Болезни, вызванные мутациями
(единичные мутации)

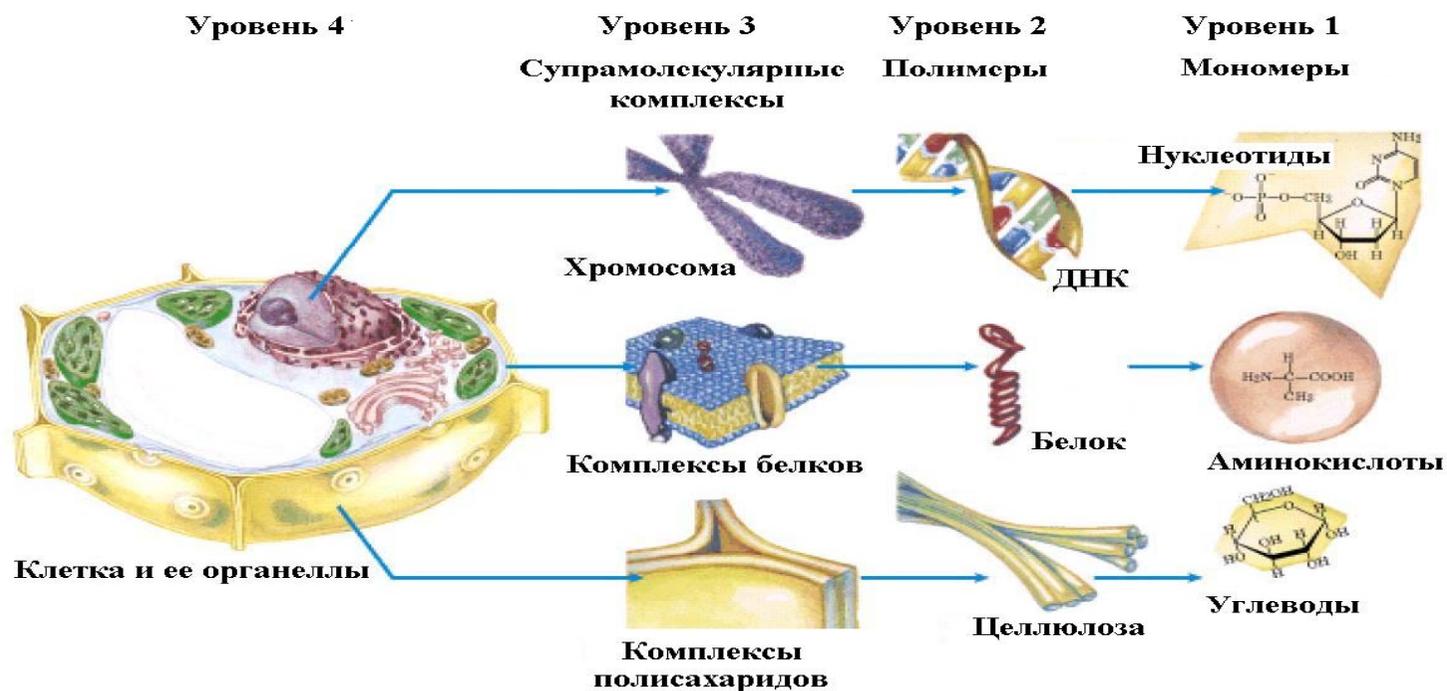
Болезни, вызванные дефицитом
незаменимых соединений
(витамины, минералы)

Болезни с нарушением обмена веществ,
вызванные мутациями и воздействием
окружающей среды
(множественные мутации +
факторы окружающей
среды)

Онкологические заболевания
(мутации + воздействие
окружающей среды)

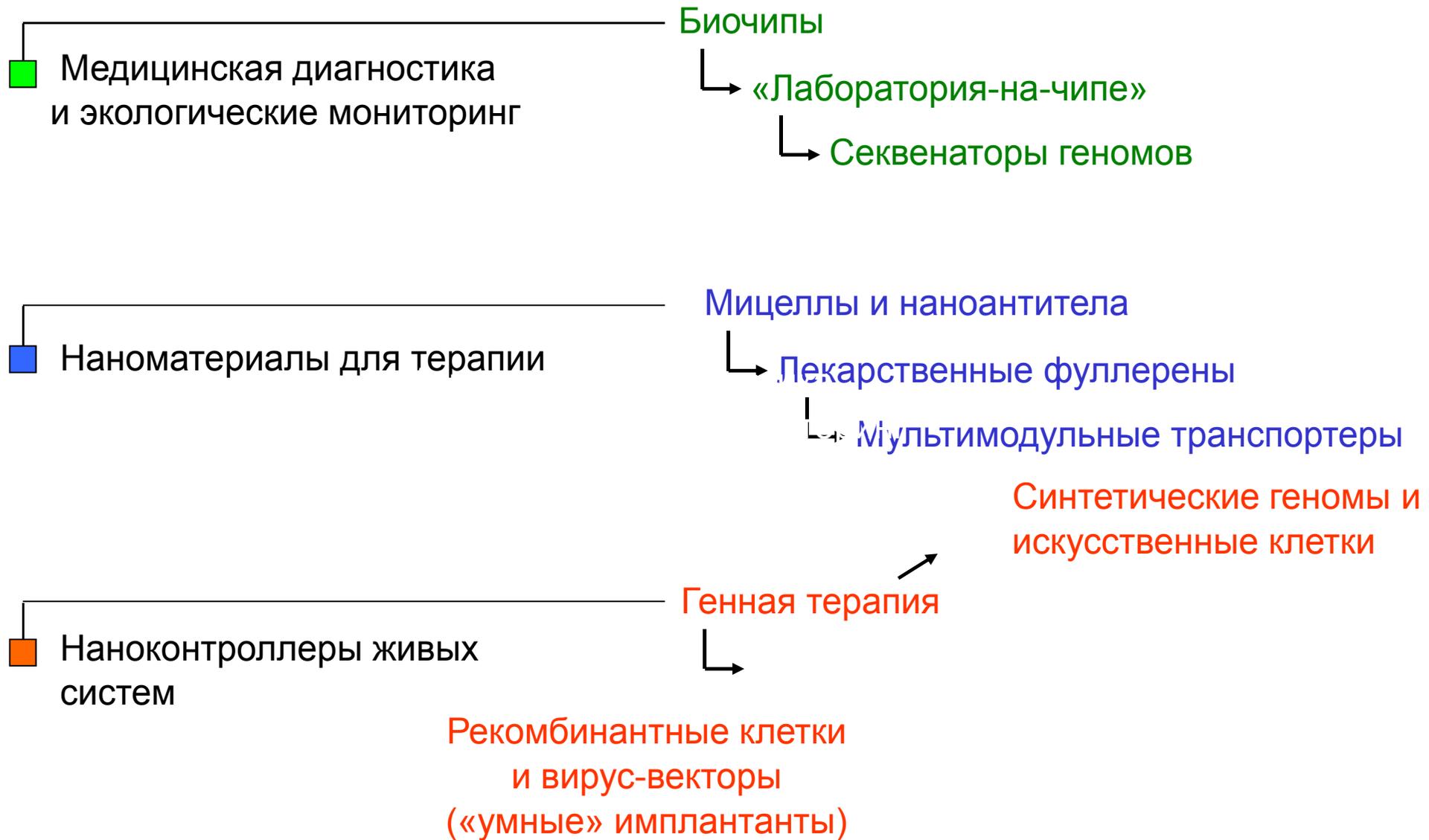
Медицинская биофизика и нанобиотехнология

- 1). БИОМЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА
- 2). СРЕДСТВА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ
- 3). ГЕНОТЕРАПИЯ
- 4). КОНТРОЛЬ СОСТОЯНИЯ И ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЕ
- 5). НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

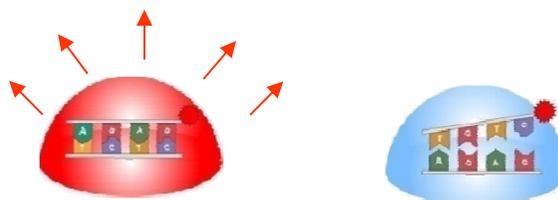
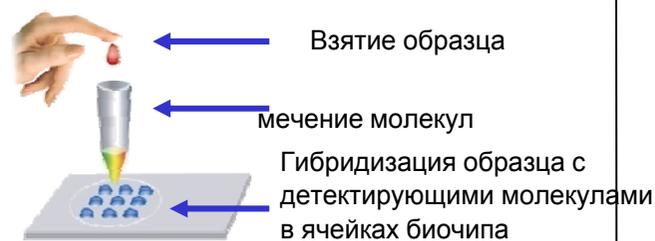


ТОЧКИ РОСТА

ПРОДУКТЫ



- ТУБЕРКУЛЕЗ и его лекарственно- устойчивые формы (по 70 мутациям)
- ОНКОЗАБОЛЕВАНИЯ (15 типов)
- ВИЧ, гепатиты В и С (22 подтипа)
- ОСПУ, ветряную оспу, простой ГЕРПЕС (2 типа), оспу животных (8 типов)
- СИБИРСКУЮ ЯЗВУ
- БИОТОКСИНЫ (7 типов)
- ГРИПП (15 подтипов)
- ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИЧНОСТИ (ошибка < 0,1%)



При соответствии
- есть сигнал в ячейке



регистрационное удостоверение
№ ФС 03262004/0889-04

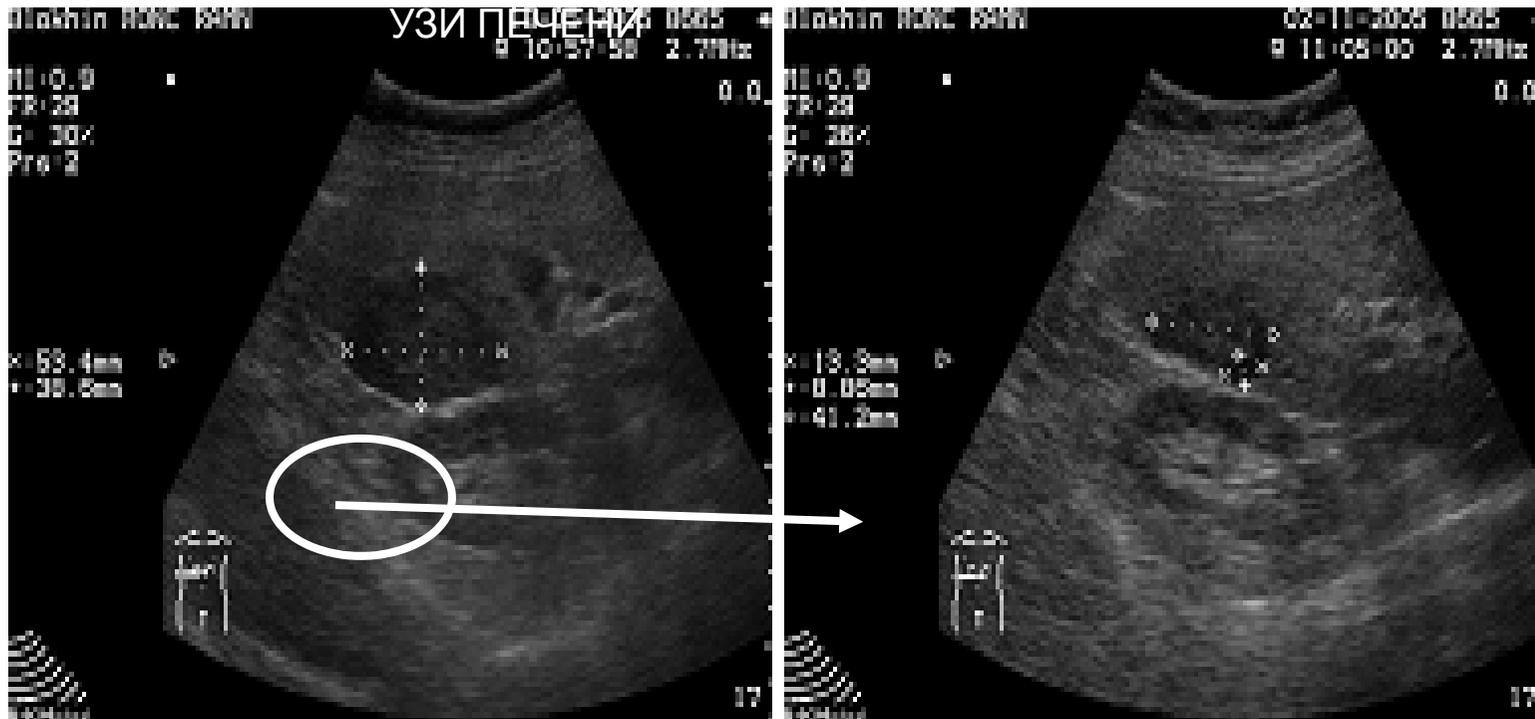


Молекулярные технологии. Технология ДНК- и белковых чипов

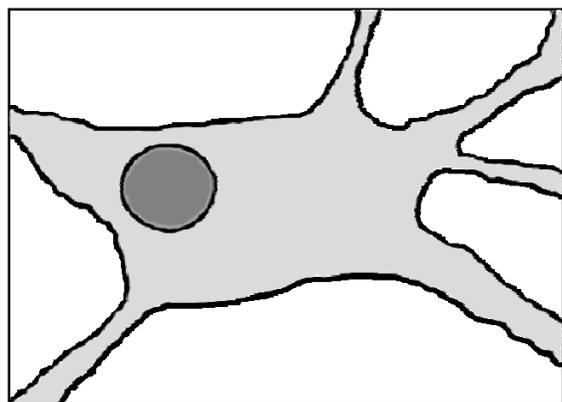
Клеточные технологии.

Этапы генетического программирования:

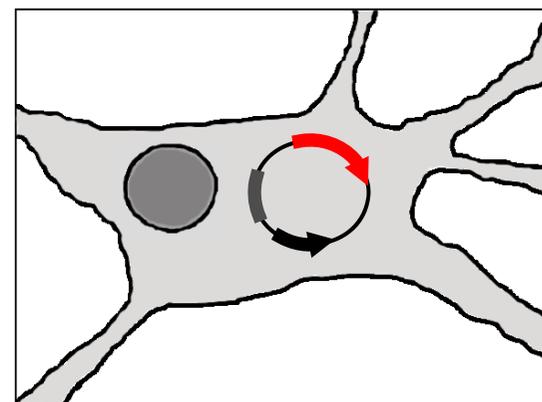
- опухолевые клетки пациентов культивируются вне организма
- программируются с помощью наночастиц, содержащих ДНК, кодирующую ген иммуноактиваторного белка;
- модифицированные клетки вводят больному
- запуск собственного иммунитета, направленного против опухолевых клеток.



СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ С ТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ГЕННЫМИ КОНСТРУКТАМИ – «УМНЫЕ» ИМПЛАНТАНТЫ



ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ПРОГРАММИРОВАНИЕ



Трансплантация в
целях терапии

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ В
ИШЕМИЗИРОВАННЫХ ТКАНЯХ МОЗГА,
СЕРДЦА И СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

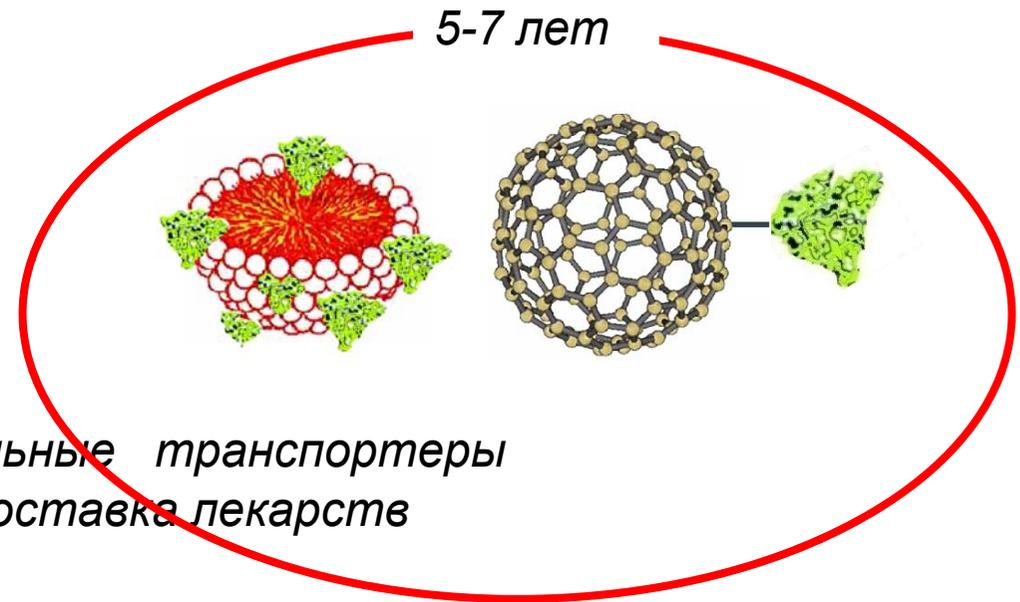
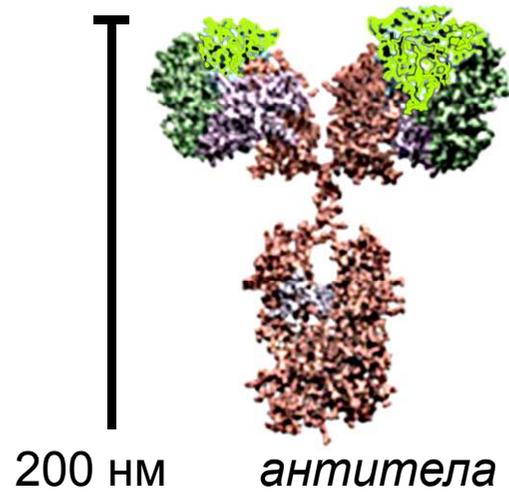
Нанотерапия и доставка лекарств

Наноантитела

1-3 года
→

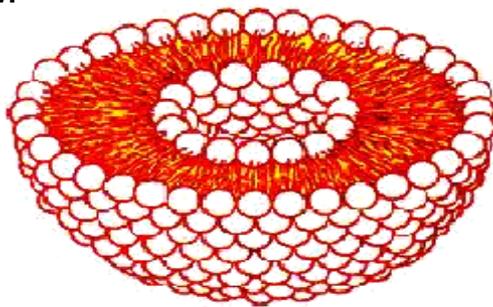
2-5 нм

- технологичны
- дешевы
- долговечны



липосомы

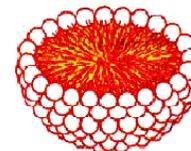
200 нм



Транспортные термоллипосомы

1-3 года
→

30-50 нм



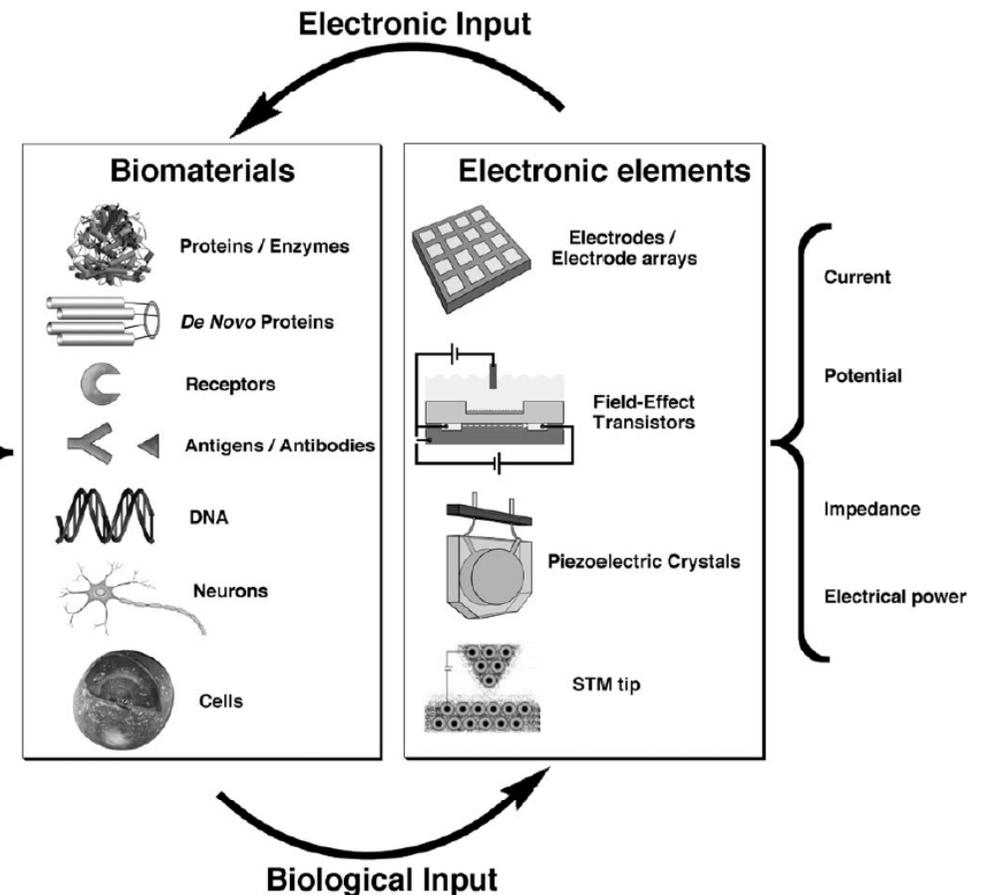
Биоэлектроника это...



- ...is a field of research that works to establish a synergy between electronics and biology

- ...is the application of electrical engineering principles to biology, medicine, behavior, or health

- ... биология + электроника + нанотехнологии



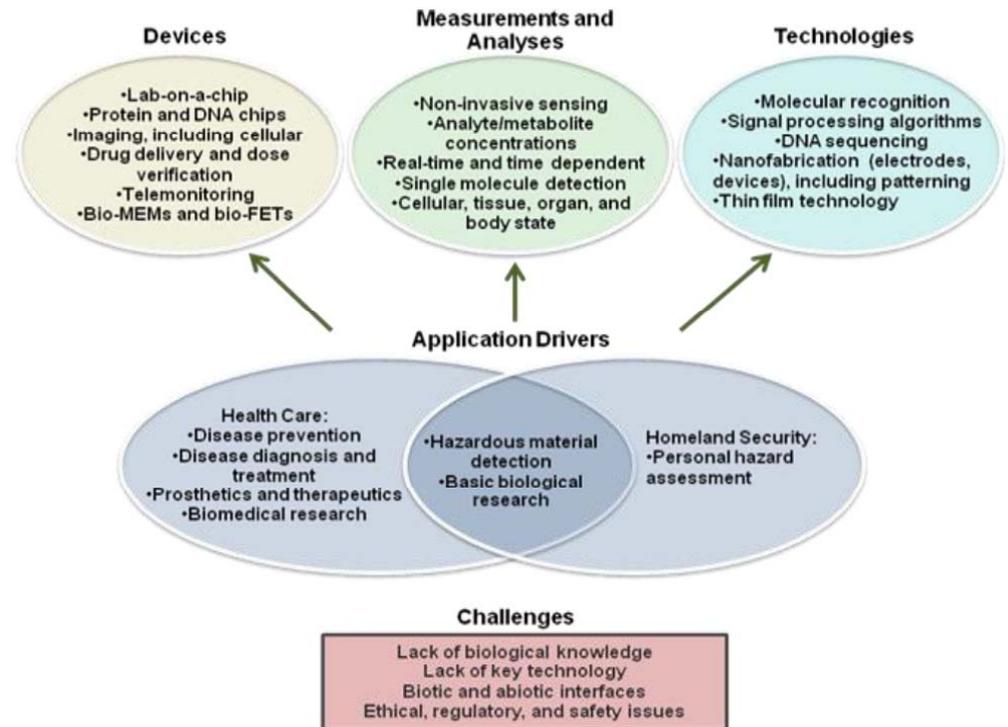
Основные области

- Биомедицина
- Мозг
- Интерфейс человек-машина
- ...

Bioelectronic medicines:
a research roadmap

*Karen Birmingham, Viviana Gradinaru, Polina Anikeeva, Warren M. Grill,
Victor Pikov, Bryan McLaughlin, Pankaj Pasricha, Douglas Weber, Kip Ludwig
and Kristoffer Famm*

Soft Matter, 2013, **9**, 6571

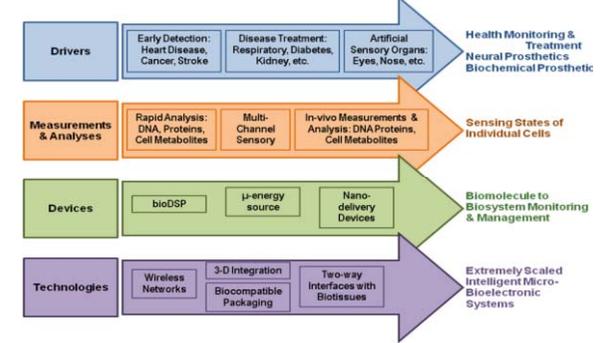


A Framework for
BIOELECTRONICS
Discovery and Innovation
February 2009

**Electrochemical biocomputing: a new class of
molecular-electronic logic devices**

Yongmei Jia,[†] Ruixue Duan,[†] Fan Hong, Boya Wang, Nannan Liu and Fan Xia

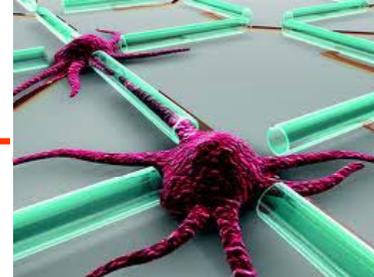
Мировые тенденции развития биоэлектроники на ближайшие 10-15 лет



1. Выявление механизмов сопряжения клеток и биомолекул с электронными устройствами и их составными частями (molecular/cell-electronics interfaces);
2. Выявление механизмов формирования многообразия откликов клеток на электрические, механические, химические, температурные и т.п. воздействия;
3. Создание устройств, способных собирать и анализировать важные данные о состоянии (химическом, физическом, структурном, функциональном) биомолекул, клеток, тканей и органов;
4. Регулируемое введение лекарственных препаратов и других воздействий с возможностью реализации терапевтического эффекта и эффектов управления в режиме реального времени;
5. Создание устройств, способных идентифицировать и количественно определять большое количество биомаркеров различных состояний организма одновременно.

...еще более 20 направлений

Базовые технологии научно-технического комплекса биоэлектроники

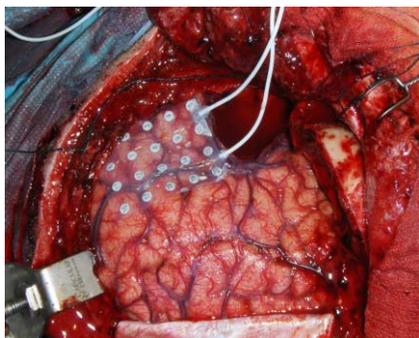


- Получение структур, обеспечивающих молекулярное узнавание, включая генетическую инженерию
- Быстрое секвенирование ДНК, определение структуры и уровня экспрессии белковых молекул, метаболом клетки
- Изготовление микросенсоров, микрофлюидных и микроэлектромеханических устройств
- Носимые и имплантируемые источники энергии, системы беспроводной передачи энергии
- Тонкопленочные технологии
- Алгоритмы сбора и обработки сложных сигналов

Основные направления развития научно-технического комплекса биоэлектроники

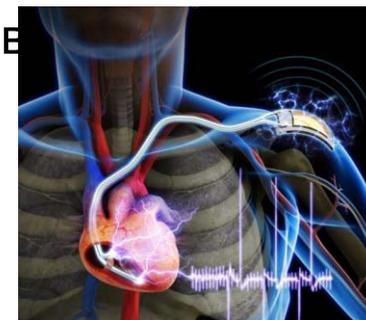
- **Мультимодальный интерфейс клетка-компьютер-клетка**

- выявление фундаментальных механизмов и создание адекватных математических и логико-вероятностных моделей формирования многообразия откликов отдельных клеток и тканей на электрические, механические, химические, температурные и другие воздействия с целью создания эффективных нейроимплантантов, новых органов чувств, специализированных клеточных процессоров и биомолекулярных логических элементов

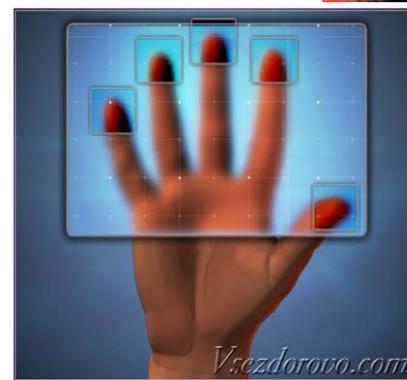


Имплантируемые и носимые системы диагностики и терапии

- для сбора и анализа данных о состоянии биомолекул, клеток, тканей и организма и возможностями реализации терапии и эффектов управ

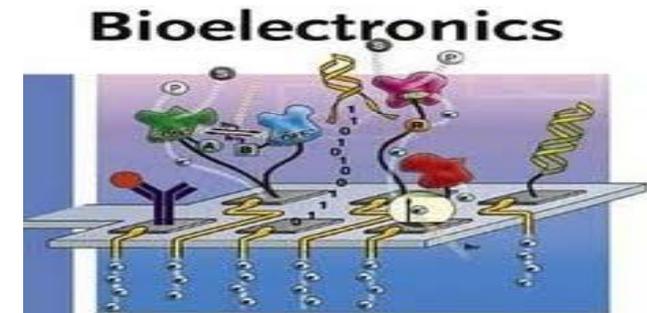


Цели



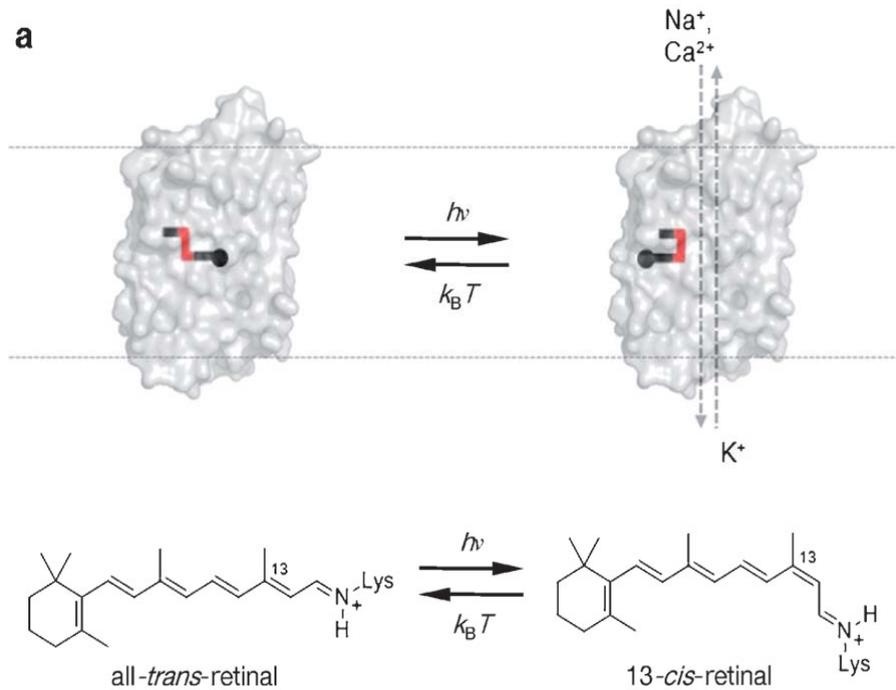
	Сейчас	Перспектива
Датчики, сенсоры	одноканальные	многоканальные
Источники тока	химические элементы, токсичность, размеры и вес	автономность, имплантируемость, миниатюрность
Новые органы чувств		
зрение	380-780 нм	УФ, ИК
слух	20-20000 Гц	например УЗ
обоняние, вкус	ограниченное число компонентов	«химическое зрение»
«Умная аптечка» (тераностические устройства)	отсутствуют	разработаны
Протезы, нейроимпланты	например, кохлеарный имплант	расширение числа протезируемых органов
Нейропроцессоры	отсутствуют	разработаны

Мультимодальный интерфейс Клетка-Компьютер-Клетка



- Проведение экспериментальных исследований, создание и анализ генных, метаболических, регуляторных сетей, других адекватных математических и логико-вероятностных моделей для культур клеток и тканей.
 - Создание алгоритмов и программного обеспечения для накопления и многопараметрической обработки больших объемов экспериментальной информации.
 - Разработка новых методов моделирования метаболических и регуляторных процессов клетки.
- Создания атласа висцеральных нервов для выявления нейрональных сигнальных структур, контролирующих функции важных органов, определение конкретных нейронных структур для обеспечения целевых эффектов воздействия на выбранные органы.
- Создание методов генетической модификации клеток и тканей с целью экспрессии чувствительных к стимулам белков и белковых комплексов (чувствительных к оптическому излучению - оптогенетика, к террагерцовому излучению - террагенетика, к действию химических стимулов - хемогенетика, к акустическим колебаниям - акустогенетика и т.п.)
- Создание электродных, оптических механических, химических и т.п. структур для достижения минимально инвазивной нейромодуляции (физиологической модуляции).
- Биомолекулярная элементная база биоэлектроники
 - Молекулярные биологические приводы на основе белковых комплексов и нуклеиновых кислот
 - Биомолекулярные логические элементы
 - Клеточные процессоры

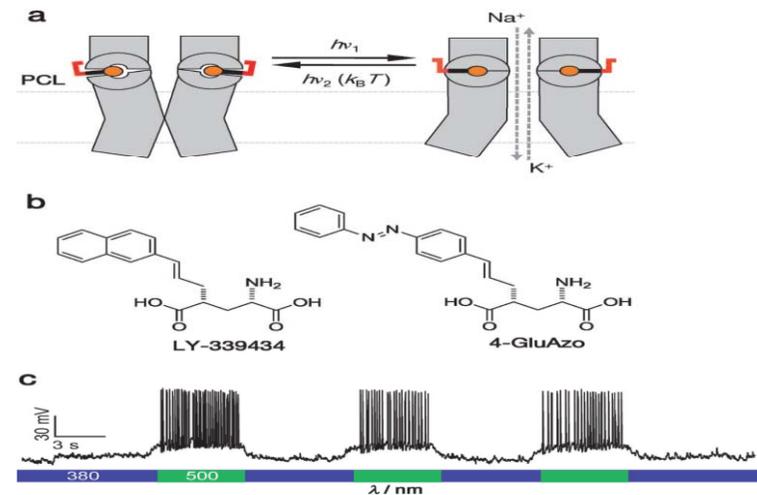
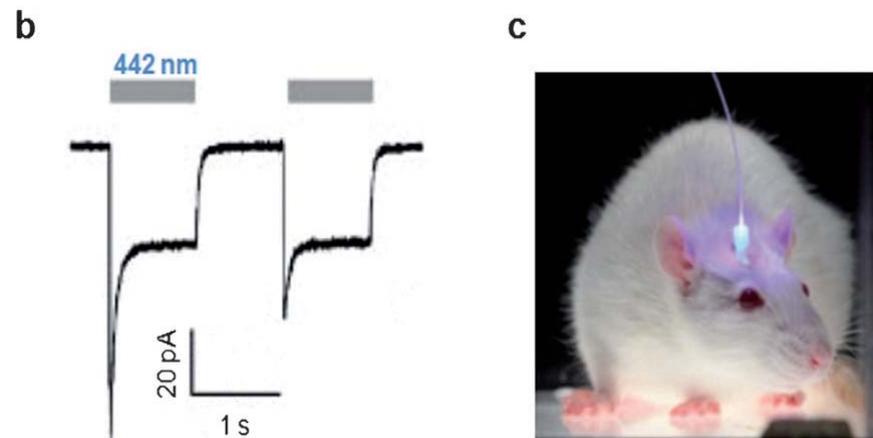
Оптогенетика



а) Схема канала, связанного с хромофором 13-транс-ретиаль, который подвергается изомеризации при облучении синим светом и тепловой релаксации, что регулирует активность канала

б) Облучение светом активирует канал и вызывает деполяризацию мембраны клетки

в) Обратите внимание на волоконно-оптический кабель, который обеспечивает свет вглубь мозга

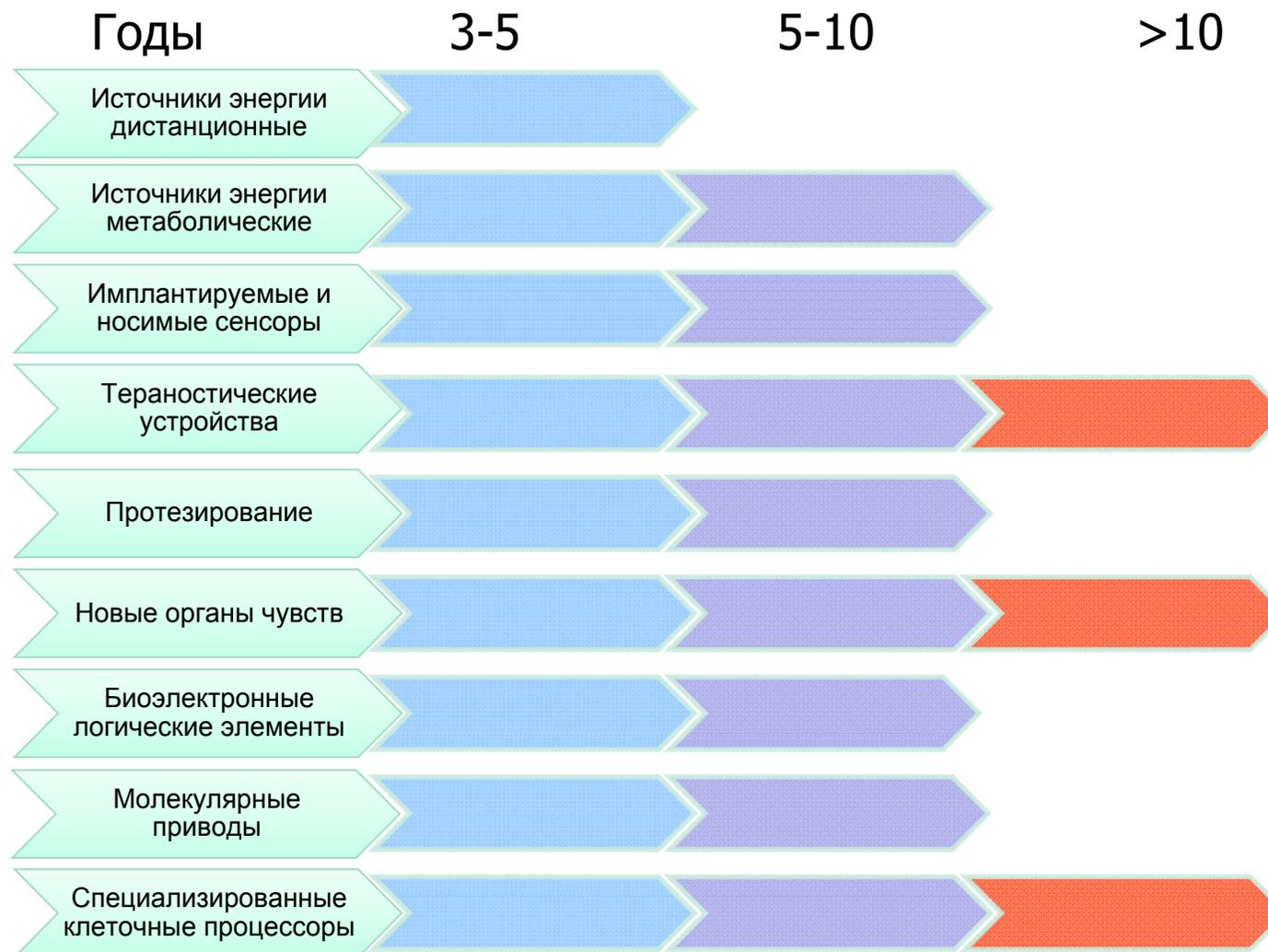


Имплантируемые и носимые системы диагностики и терапии

- Имплантируемые и минимально инвазивные носимые устройства, способные собирать и анализировать важные данные о состоянии (химическом, физическом, структурном, функциональном) биомолекул, клеток, тканей и органов
- Направленная доставка лекарственных препаратов и других воздействий с возможностью реализации терапевтического эффекта и эффектов управления в режиме реального времени
- Имплантируемые и минимально инвазивные носимые устройства, способные одновременно идентифицировать и количественно определять большое количество (тысячи) биомаркеров и метаболитов
- Источники энергии, работающие за счет метаболических процессов
 - Метаболические топливные элементы
 - Миниатюризация источников энергии при использовании схем дистанционной передачи энергии за счет электромагнитного СВЧ и электромагнитного ближнепольного каналов, оптического ИК излучения и пьезоэлектрических и ультразвуковых колебаний

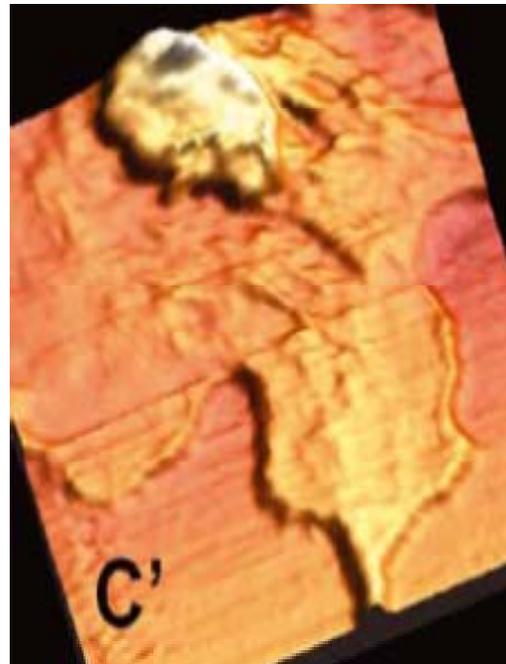
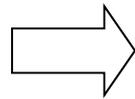
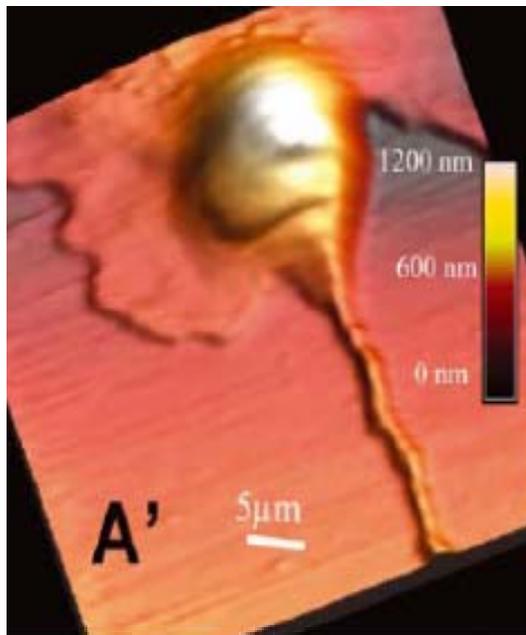
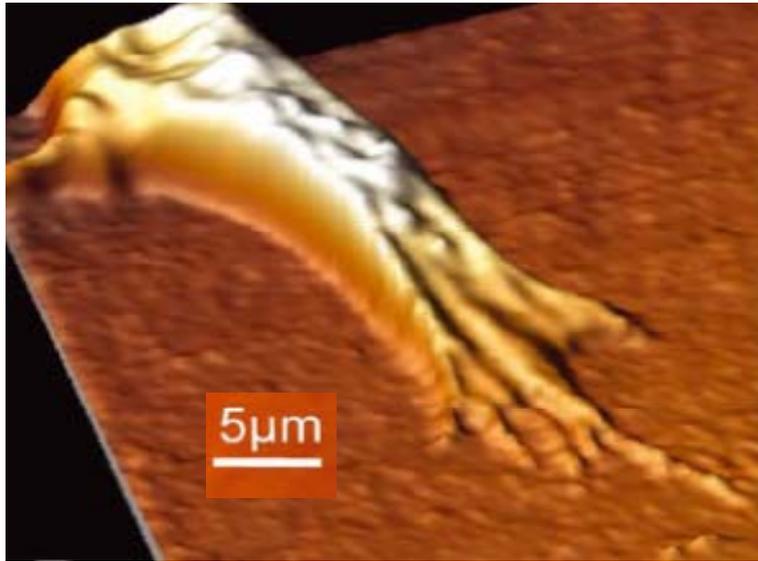


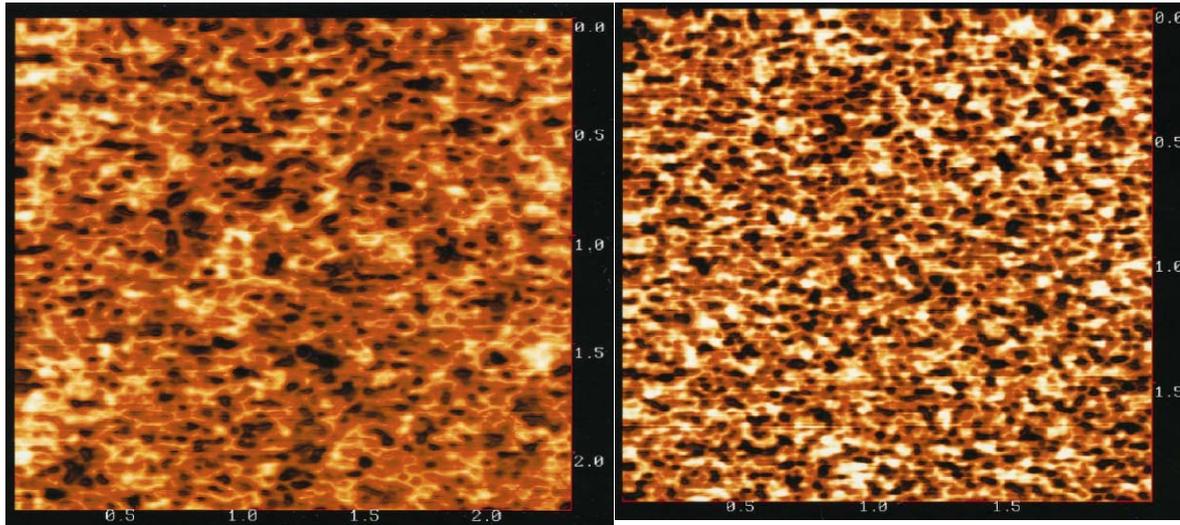
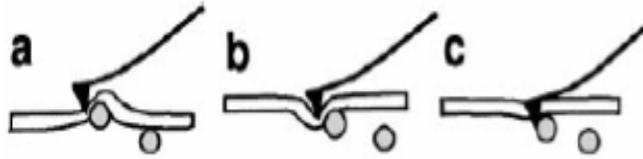
Группы продуктов



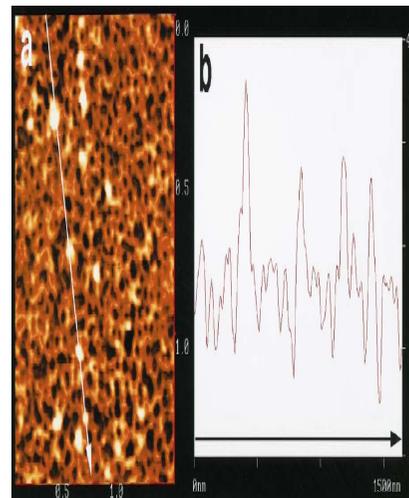
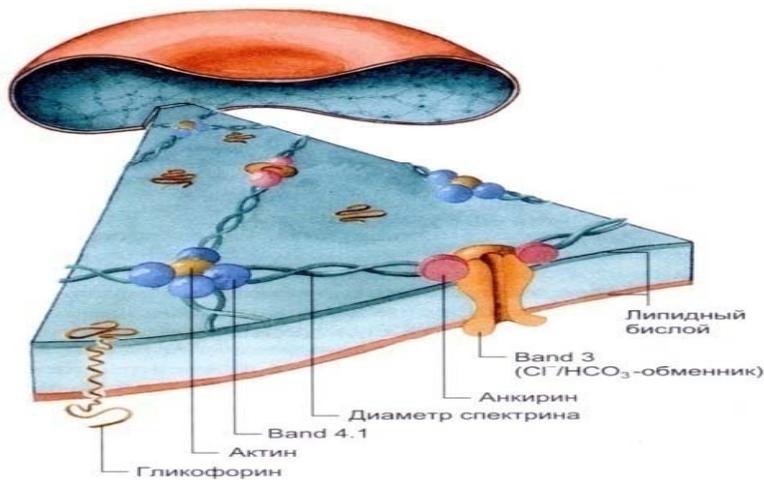
Three-dimensional imaging of living and dying neurons with atomic force microscopy
HELEN A. MCNALLY and RICHARD BEN BORGENS

Прорастание и гибель нервной клетки

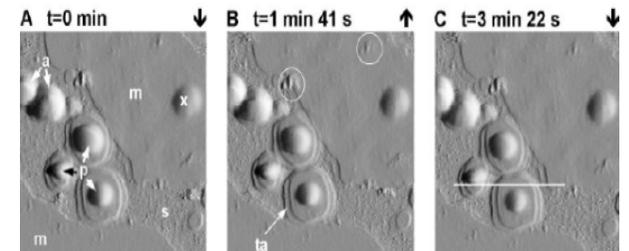
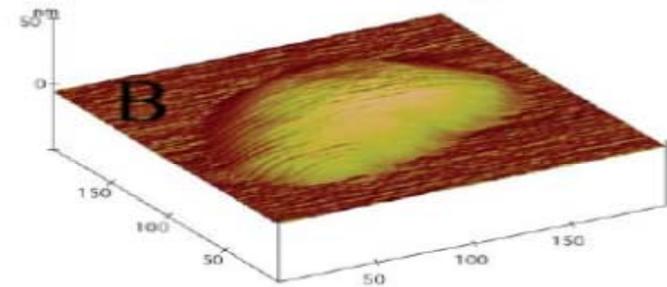
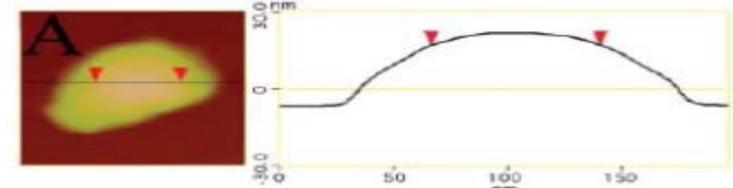
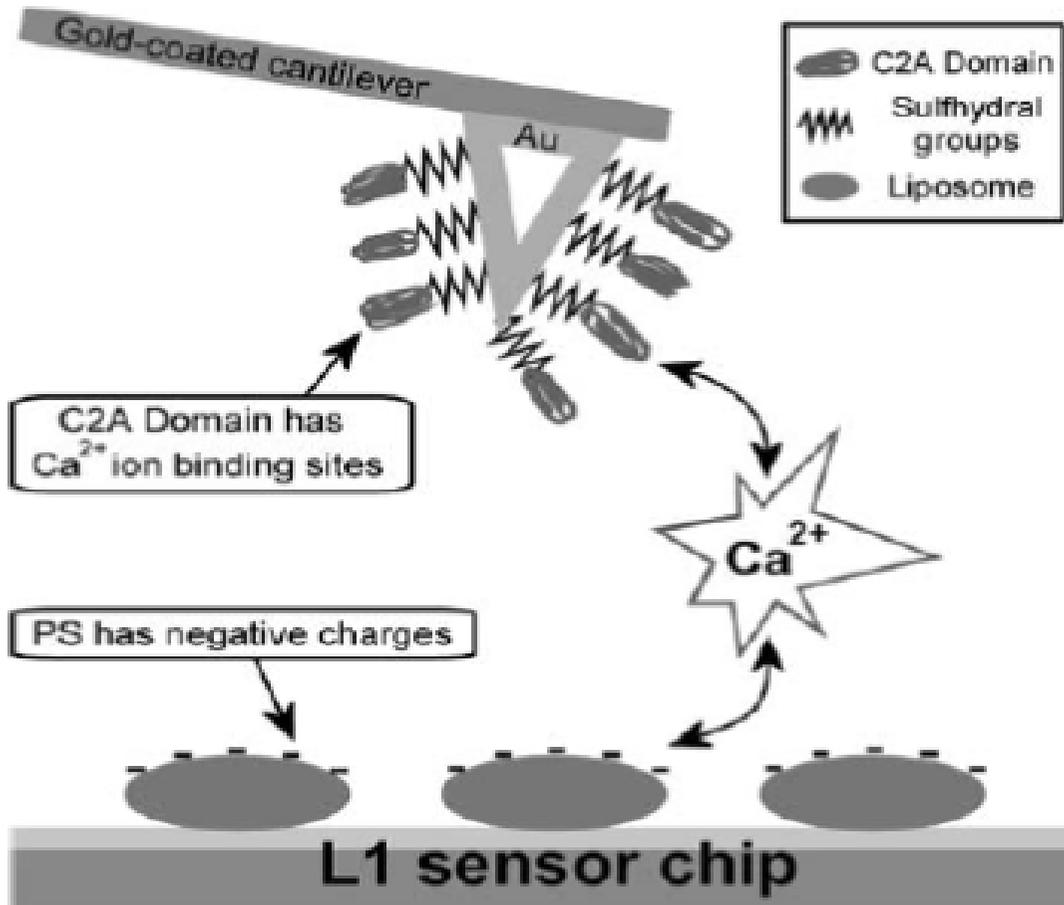




Внешняя (А)
и внутренняя
стороны (Б)
мембраны
эритроцита



Взаимодействие фрагмента белка с ЛИПОСОМАМИ

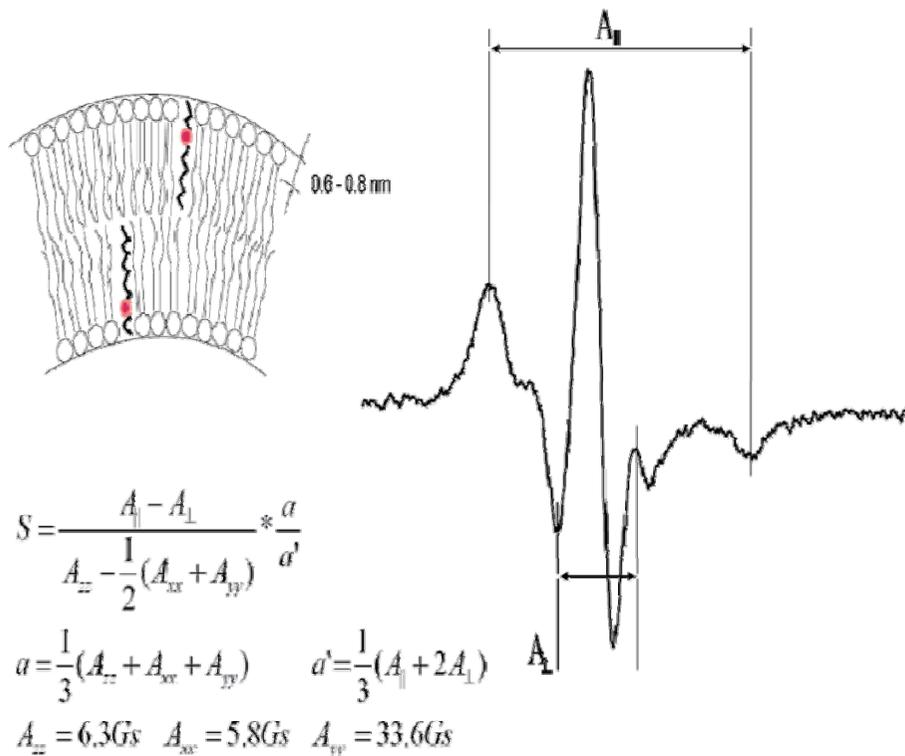


ESR -method to detect membrane fluidity with spin probes: 5-doxylstearinic acid (5-DS) and 16-doxylstearinic acid (16-DS)

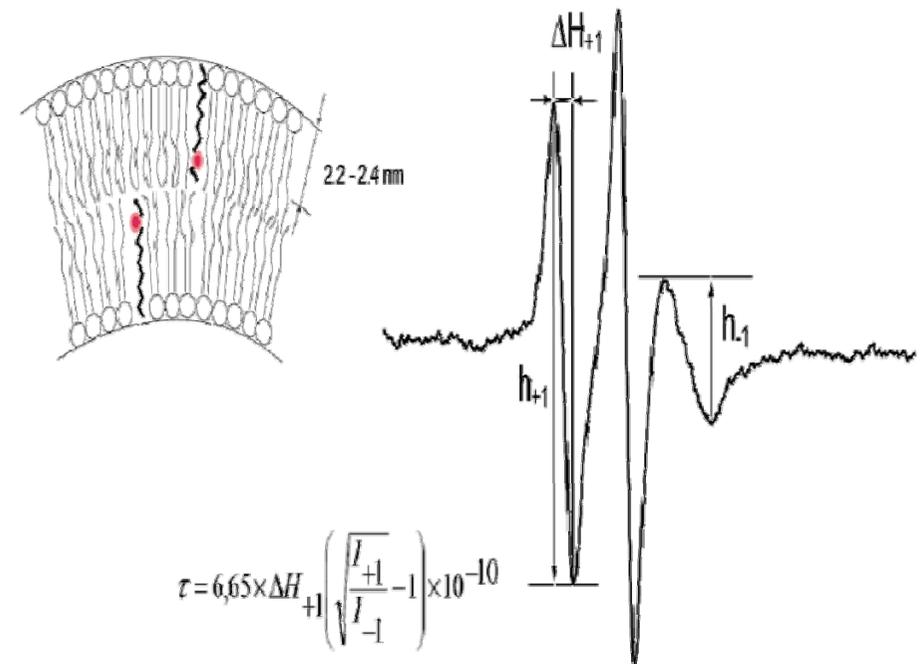
5-DS: be sensitive to membrane viscosity fluctuation at **0.6-0.8 nm** from membrane surface

16-DS: be sensitive to membrane viscosity fluctuation at **2.2-2.4 nm** from membrane surface

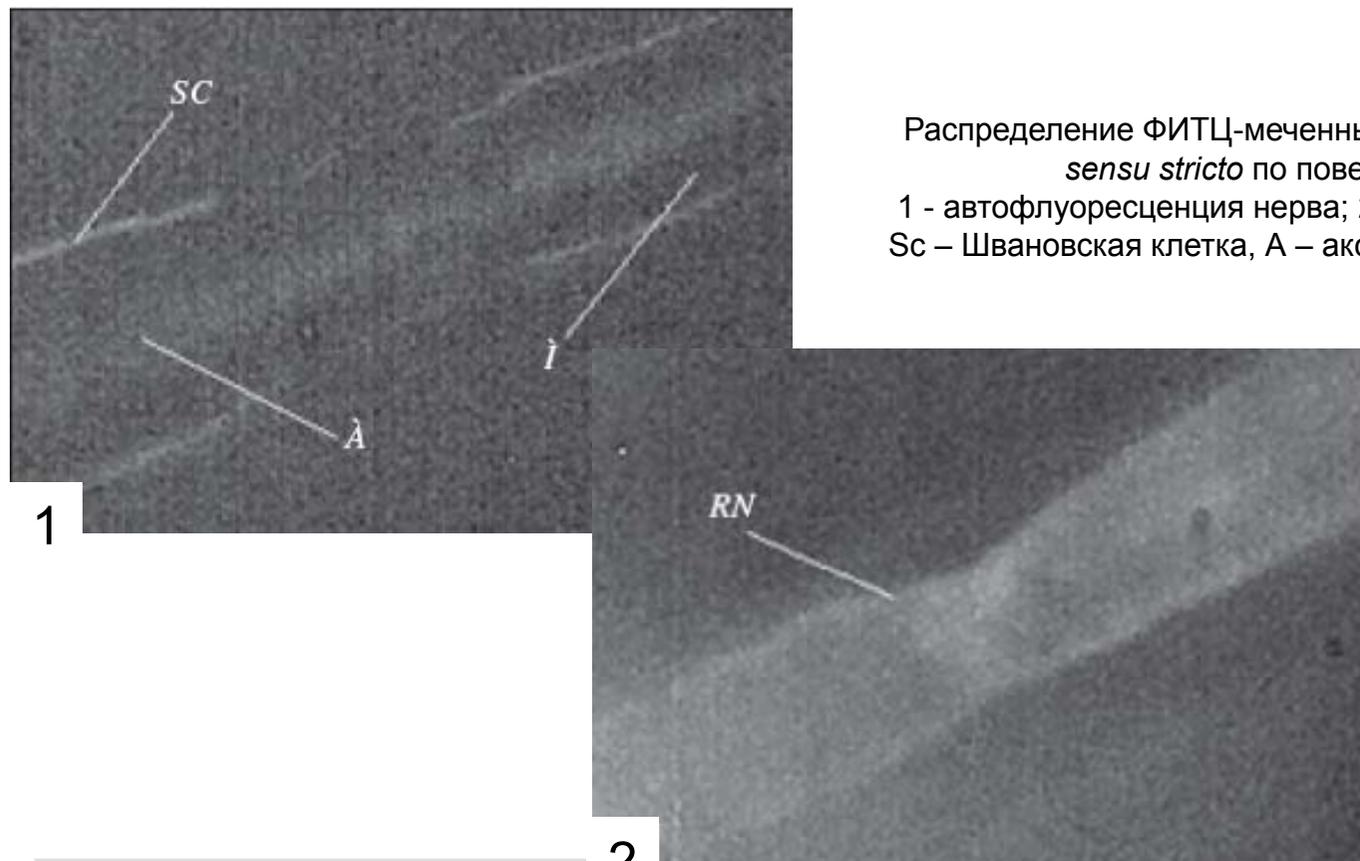
5-doxylstearic acid



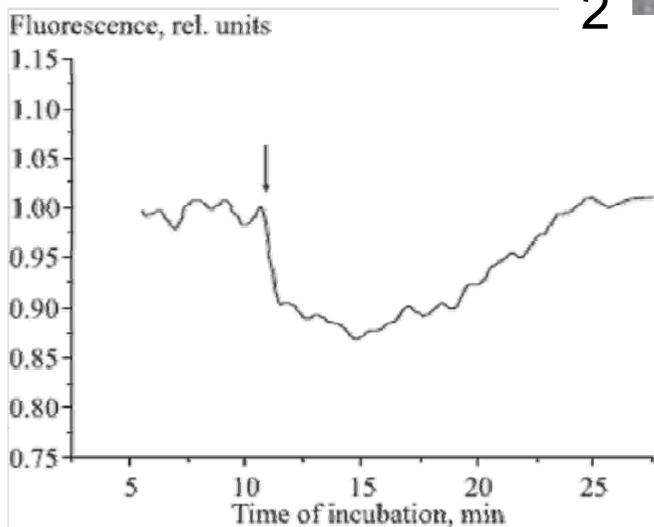
16-doxylstearic acid



Лайм боррелиоз



Распределение ФИТЦ-меченных поверхностных белков *Borrelia burgdorferi sensu stricto* по поверхности нерва в области перехвата Ранвье. 1 - автофлуоресценция нерва; 2 - флуоресценция ФИТЦ-меченных белков. Sc – Швановская клетка, А – аксон, I – интернодаль, RN – перехват Ранвье. Увеличение $\times 60$.



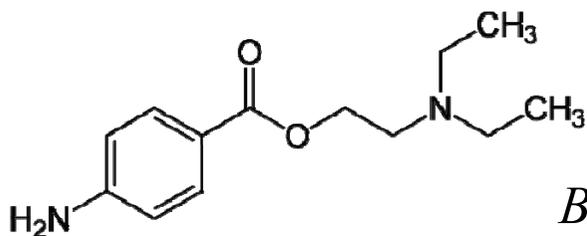
Характерная кинетика содержания мембраносвязанного кальция при действии на МНВ белков Мг9 (0,05 мг/мл). По оси абсцисс – время, мин, по оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, отн. ед.. Внесение ПБ – 0 мин, отмечено стрелкой.

Effect of Proteins from the Spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato* on Myelinated Nerve Excitability

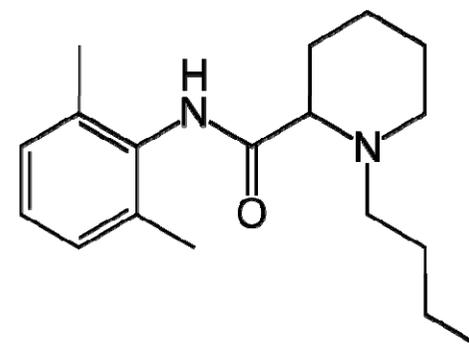
N. N. Rodionova, N. A. Brazhe, A. R. Brazhe, I. G. Kharitonov*, and G. V. Maksimov

Проблемы, связанные с использованием классических локальных анестетиков

Чем опасны высокие концентрации локальных анестетиков?



Введение обезболивающих при анестезии



Прямое действие анестетика на пейсмейкеры сердца

Изменение времени проведения возбуждения в отдельных частях сердца

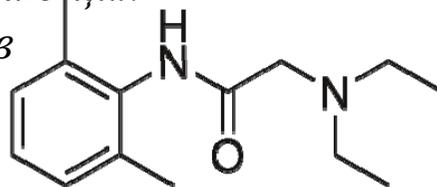
Синусная брадикардия

Блокада тормозных кортикальных нейронов

Потеря сознания, судороги

Блокада тормозных и возбуждающих нейронов

Остановка работы жизненно важных органов



Prolonged sensory-selective nerve blockade

Itay Sagie and Daniel S. Kohane¹

Laboratory for Biomaterials and Drug Delivery, Department of Anesthesiology, Division of Critical Care Medicine, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

Edited* by Robert Langer, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved January 8, 2010 (received for review October 6, 2009)

Sensory-selective local anesthesia has long been a key goal in local anesthetic development. For example, it allows women to be pain-free during labor without compromising their ability to push. Here we show that prolonged sensory-selective nerve block can be produced by specific concentrations of surfactants—such as are used to enhance drug flux across skin—in combination with QX-314, a lidocaine derivative that has relative difficulty penetrating nerves. For example, injection of 25 mM QX-314 in 30 mM octyl-

We hypothesized that surfactant CPEs also would prolong nerve blockade from quaternary lidocaine derivatives, as they did for tetrodotoxin. Here we show that this hypothesis is correct, insofar as prolonged blockade was achieved by certain combinations of surfactants and lidocaine derivatives. Surprisingly—and much more importantly—we found that combinations of specific concentrations of lidocaine derivatives and surfactants produced very prolonged sensory-specific nerve blocks.

Цели:

- 1) Исследовать анестезиологическое действие смеси лидокаина и ПАВ на седалищный нерв
- 2) Найти концентрационные диапазоны ПАВ, при которых наблюдается усиление анестезирующего эффекта лидокаина

Задачи:

- 1) Подобрать концентрационные диапазоны для местного анестетика (лидокаина) и ПАВ (DTAB), не нарушающие нормальное функциональное состояние нерва
- 2) Изучить влияние ПАВ на амплитуду ПД нерва, а также исследовать его физико-химические свойства
- 3) Исследовать влияние смеси лидокаина + ПАВ на кинетику амплитуды потенциала действия

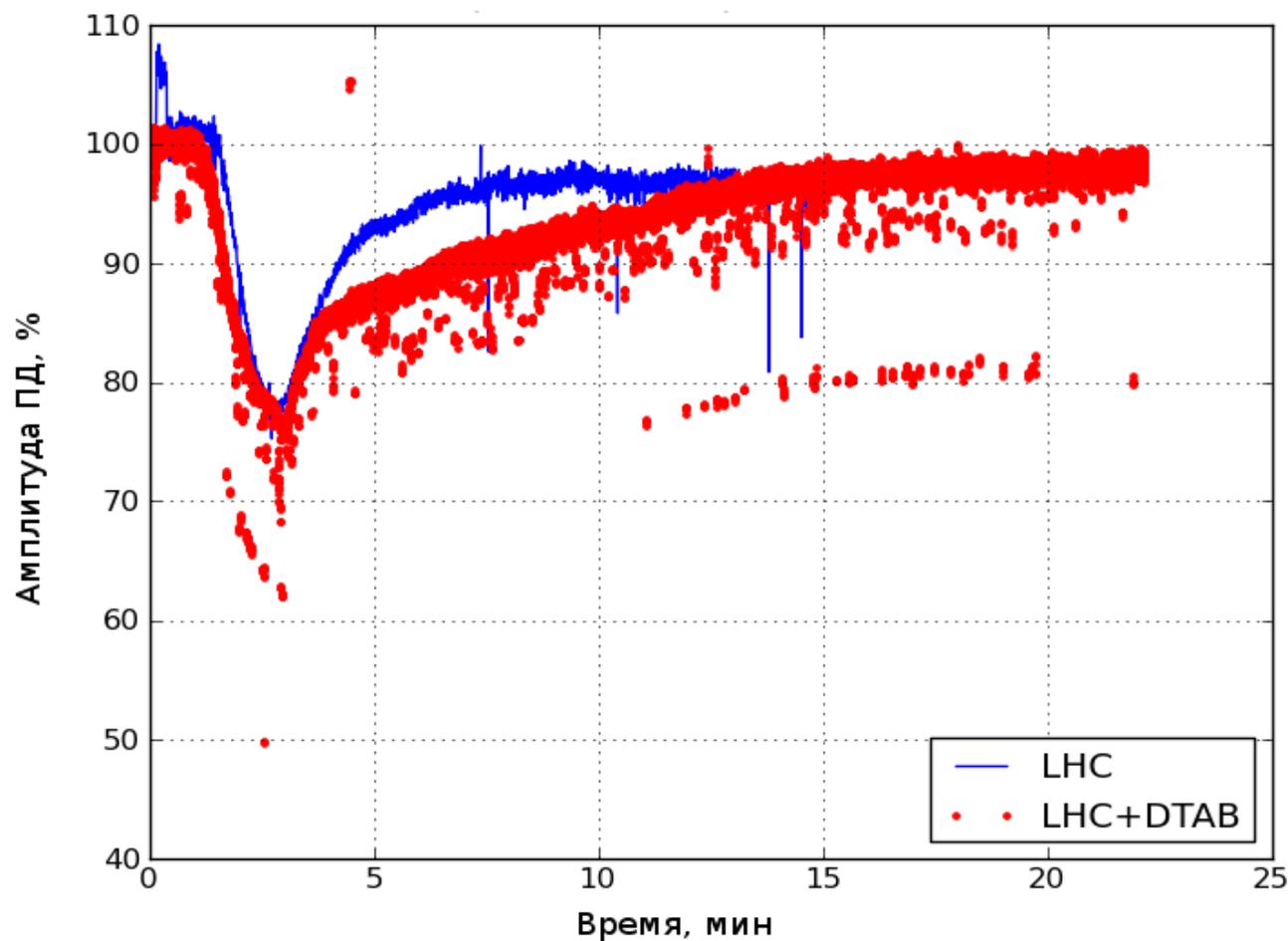
Действие смеси 0.92 мМ ЛНС + 0.5 мМ ДТАВ на кинетику потенциала действия нерва

10 %, МИН

LHC	LHC+DTAB
0,49	1,37
0,51	0,19
0,68	0,56
1,59	1,13
0,33	0,27
1,84	0,19
1,31	1,94

90 %, МИН

LHC	LHC+DTAB
5,43	4,93
7,48	7,00
11,33	9,17
13,79	5,98
4,82	10,67
11,77	11,81



История открытия комбинационного рассеяния

1928 г.

Университет Калькутты, Индия

28 февраля 1928 г.



**Sir Chandrasekhara
Venkata Raman**



**Kariamanickam
Srinivasa Krishnan**

МГУ, СССР

21 февраля 1928 г.



**Григорий Самуилович
Ландсберг**



**Леонид Исаакович
Мандельштам**

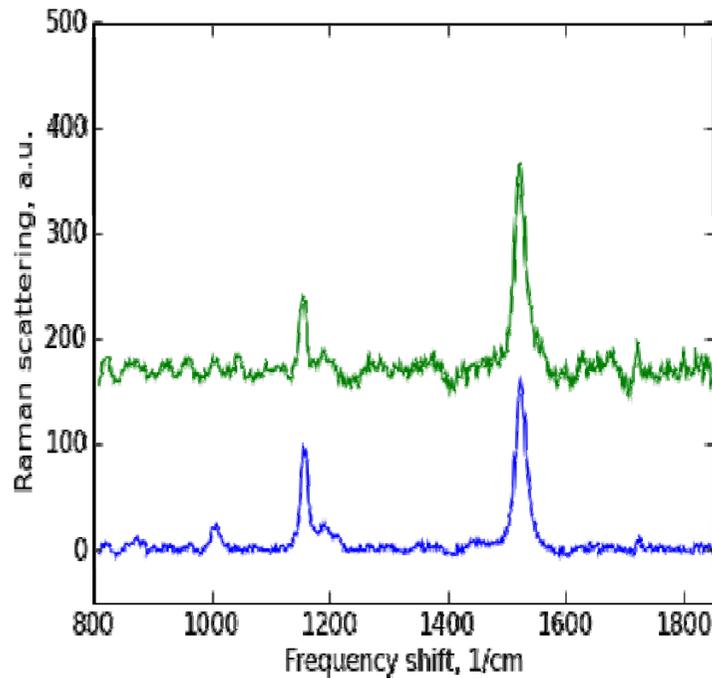
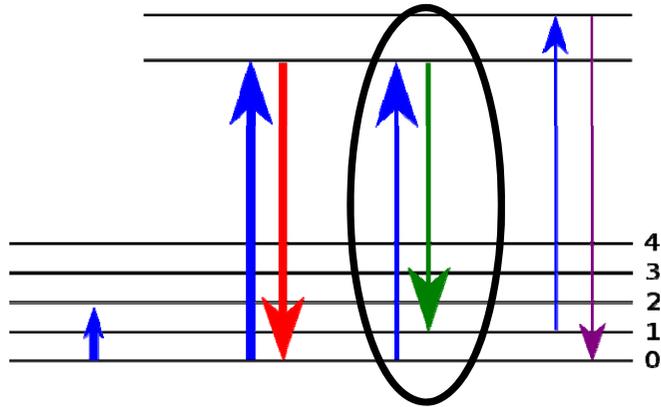
Raman scattering

Комбинационное рассеяния света

Комбинационное рассеяние света (эффект Рамана) — неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества, сопровождающееся заметным изменением частоты излучения

В случае комбинационного рассеяния света в спектре рассеянного излучения **появляются спектральные линии, которых нет в спектре первичного (возбуждающего) света**

Число и расположение появившихся линий определяется молекулярным строением вещества



Raman scattering (Raman effect) - the inelastic scattering of light on the molecules, accompanied by a noticeable change in the frequency

Raman spectrum – is dependence of intensity of Raman scattering from the frequency shift

In case of the Raman spectrum spectral lines appear in scattered light which are not present in the spectrum of the exciting light

Number and position of spectral lines determine molecular structure

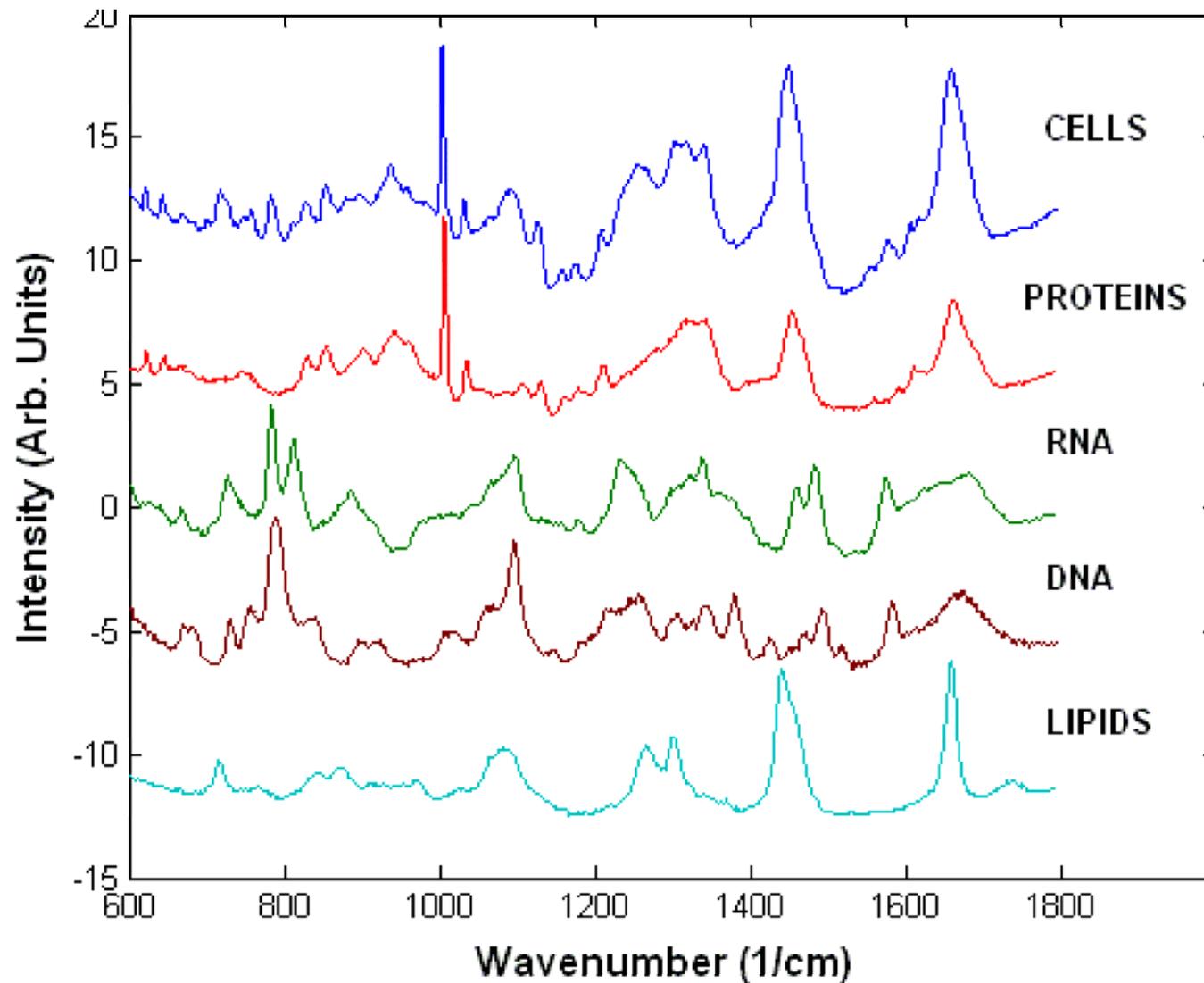
Разновидности КР спектроскопии

Резонансная КР (РКР) спектроскопия Возбуждающее излучение находится в полосе поглощения молекулы (связи), регистрируемые пики интенсивности могут быть выше нерезонансных пиков на 2-3 порядка. Резонансное КР рассеяние обусловлено когерентными колебаниями молекул, возбуждаемыми электрическим полем лазерного луча. Таким образом применяя РКР-рассеяние можно в смеси, содержащей много различных типов молекул оценивать состояние только одного, интересующего нас типа.

Гигантская КР (ГКР) спектроскопия или Рамановская спектроскопия поверхности (SERS). Данный метод основан на способности некоторых молекул в 10^5 - 10^6 раз увеличивать интенсивность пиков КР на специально подготовленных металлических поверхностях.

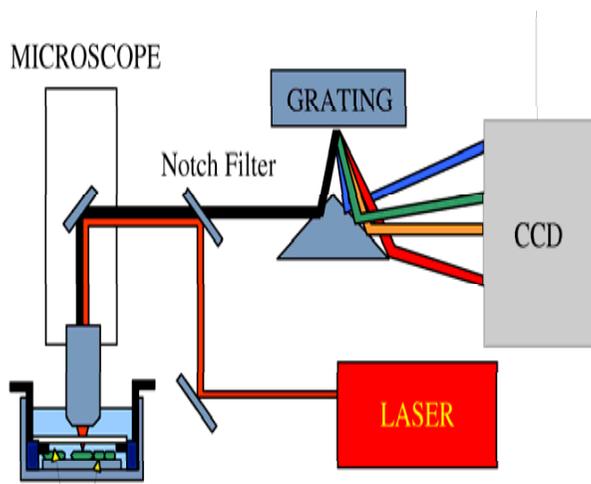
КР-микроскопия. В последнее время получает все большее распространение использование КР-микроскопов, позволяющих получать локальные изменения КР-спектров в объеме клетки. При этом пространственное разрешение таких приборов составляет порядка 1 мкм, а спектральное разрешение порядка 1 см^{-1} . Очень часто в приборе совмещаются КР- и конфокальный микроскоп или КР и атомно-силовой микроскопы.

Raman spectra of a living cell (A549) and main cell compounds



New equipment: confocal micro-Raman spectrometer

Raman spectrometer is combined with confocal microscope
As a result obtain Raman spectra from the selected cell points and can perform Raman imaging



Cells

Using Raman imaging technique we can study:

1. Distribution of a certain cell compounds;
2. Property-based compound mapping of the cell;
3. Processes in living cell

Video image of a cell

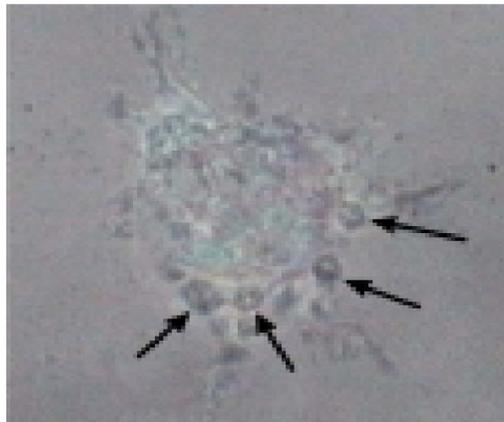
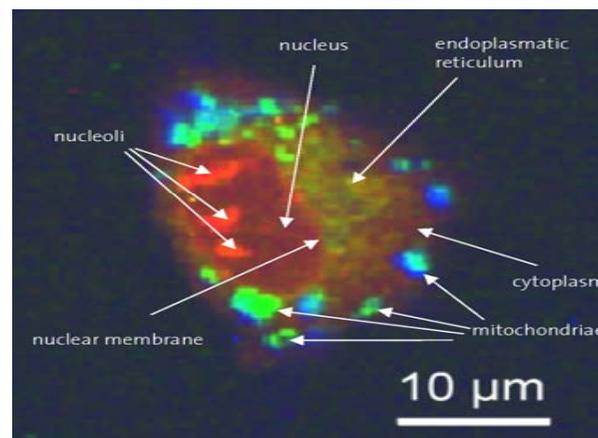
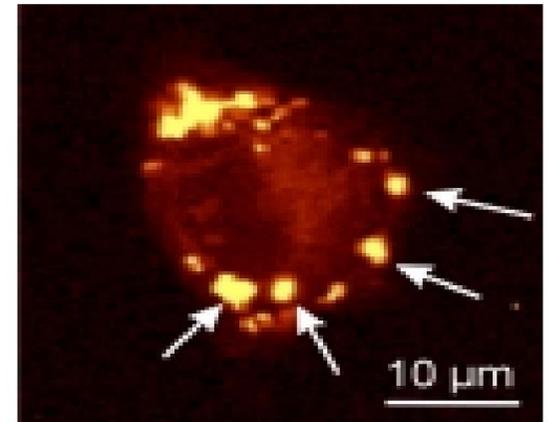


Image of distribution of the intensity of the CH-stretching band in lipids

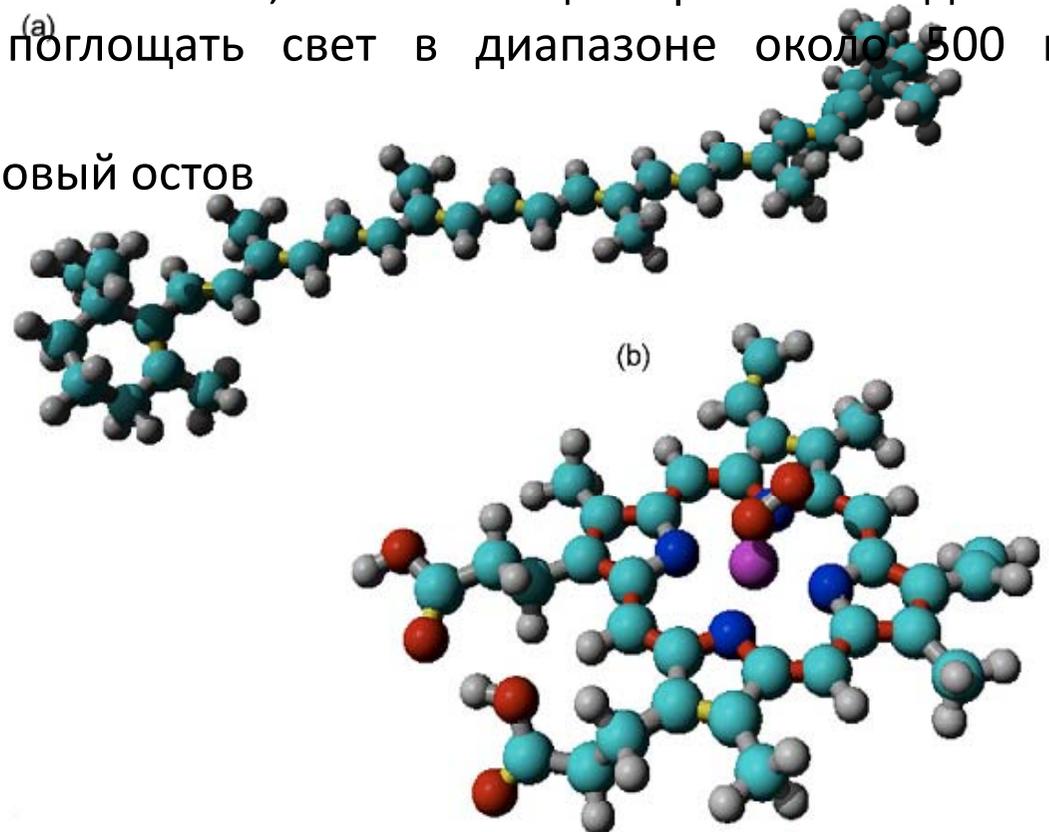


Different colours corresponds to vibrations of bonds in proteins, lipids, DNA and RNA.
No fluorescent staining!

Гем и β -каротин

Гем – это металлопорфирин и протетическая группа гемоглобина, которая катализирует разнообразные редокс-реакции. Структура гема включает макромолекулу порфирина с расширенным π -сопряжением, которая окружает атом железа, координируемый четырьмя атомами азота порфиринового кольца. Железо порфирина демонстрирует сильный электронный переход в диапазонах 390-450 нм и 500-600 нм. При резонансе возбуждающего лазера и одного из этих переходов, КР-спектр гема усиливается, а КР окружающей белковой матрицы – нет. Это позволяет проводить селективное исследование гем-связывающего сайта без какого-либо вмешательства со стороны окружения.

Каротиноиды выступают в качестве пигментов, как инициаторы и медиаторы фотохимических процессов, способны ^(a) поглощать свет в диапазоне около 500 нм. Ключевой элемент в структуре каротиноидов – π -сопряженный полиеновый остов



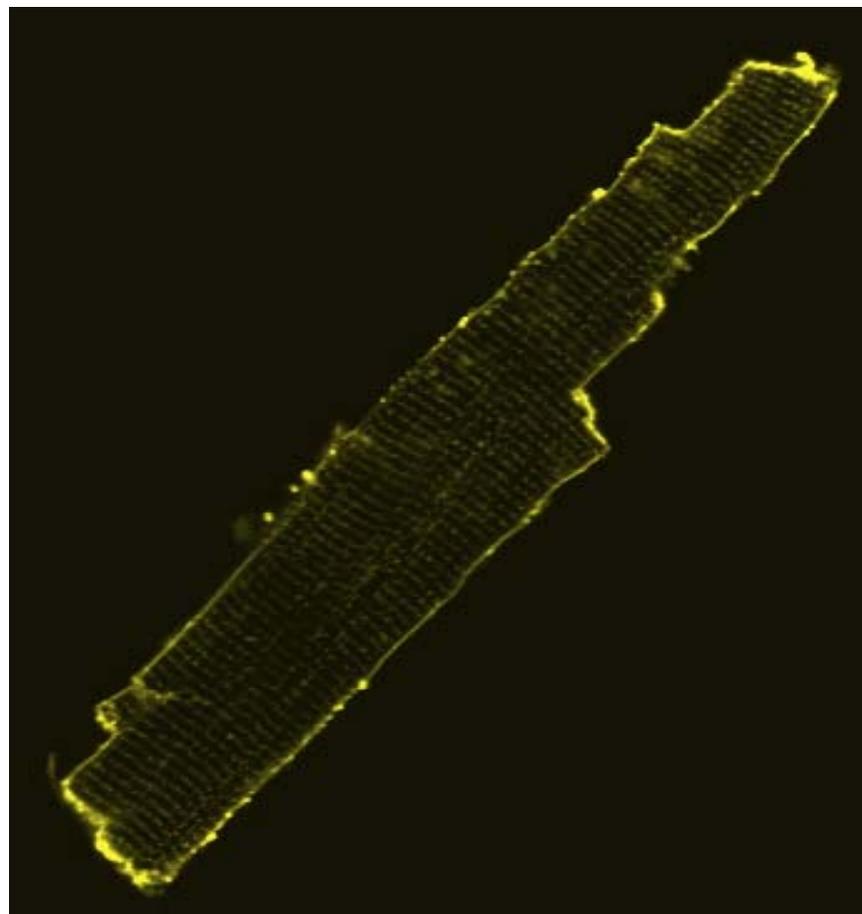
Молекулярная модель β -каротина (a) и оксигема (b). Цветами: голубой – углерод, красный – кислород, синий – азот, серый – водород, пурпурный – железо.

Важнейшие белки в клетках, содержащие металлопорфирины:

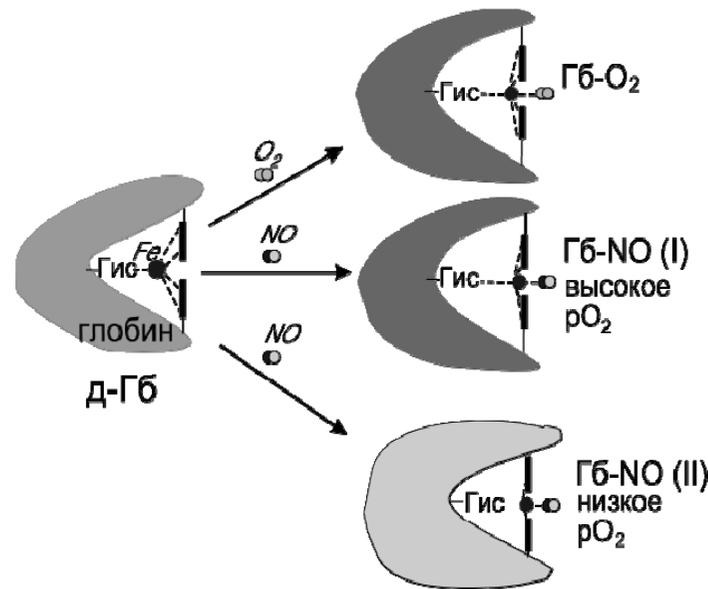
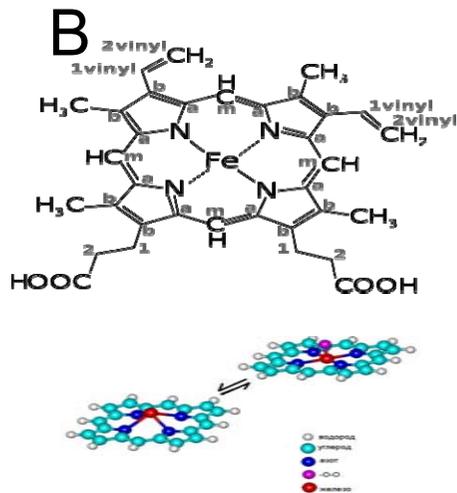
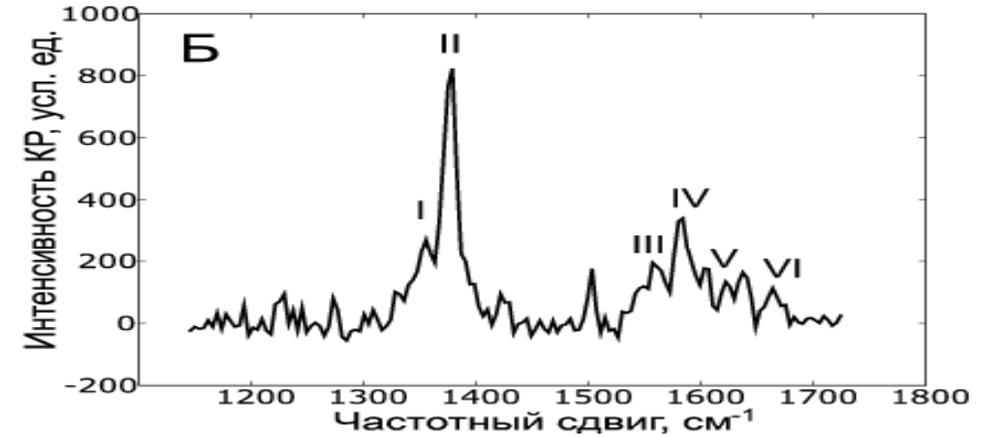
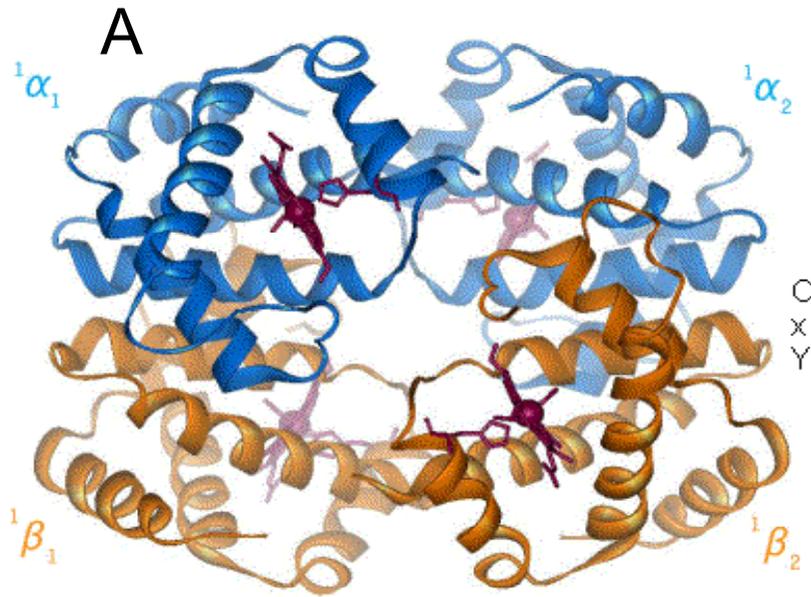
Гемоглобин в эритроцитах



Цитохромы в митохондриях кардиомиоцитов



O₂-связывающие свойства гемоглобина в целой клетке



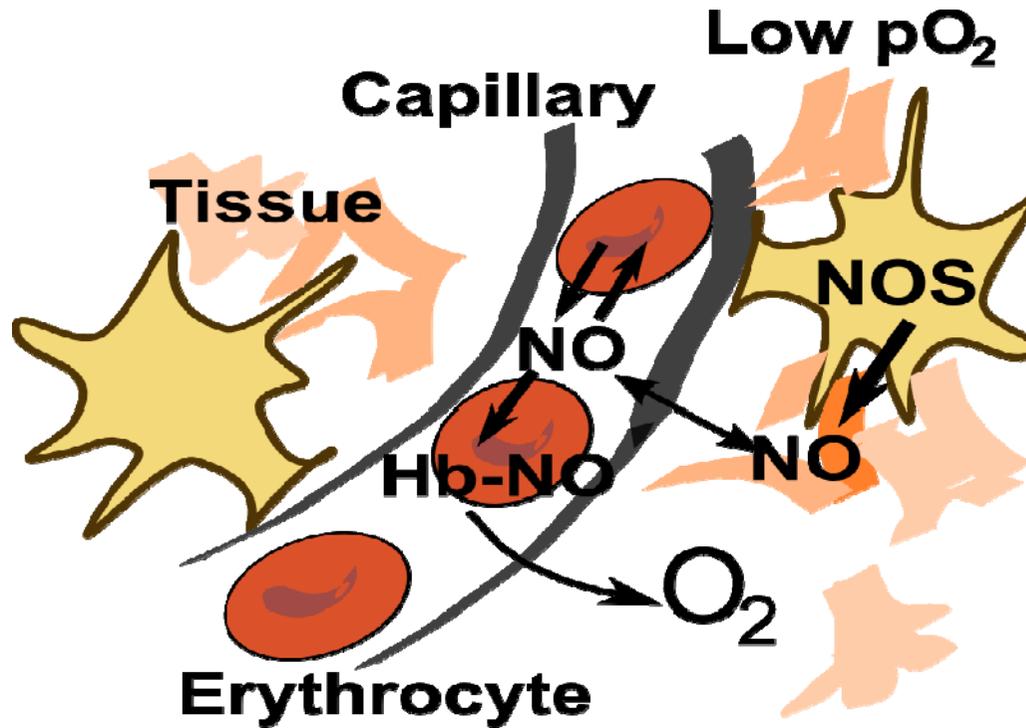
А: Молекула гемоглобина в окси-и дезокси-конформациях

Б: Спектр КР цельной крови.

В. Формула гемопорфирина

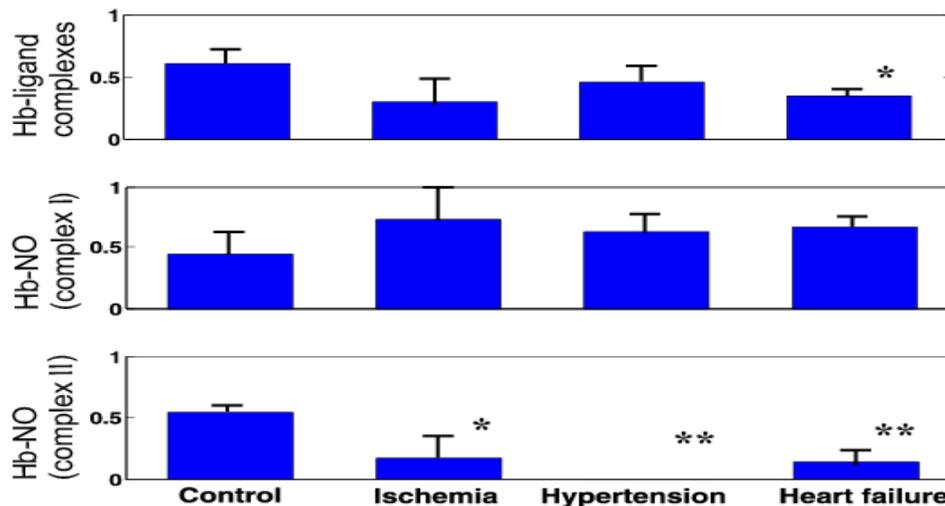
Г. Комплексы гемоглобина

NO стимулирует выход O₂ из эритроцита



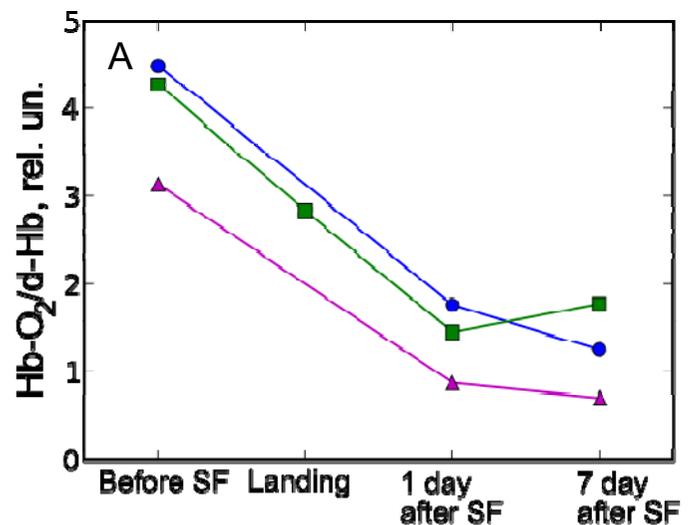
Связывание NO с Гб → Гб-NO (II) (разрыв связи между Fe²⁺ и глобином) → облегчение выделения O₂, связанного на других субъединицах Гб

Новые лекарства !

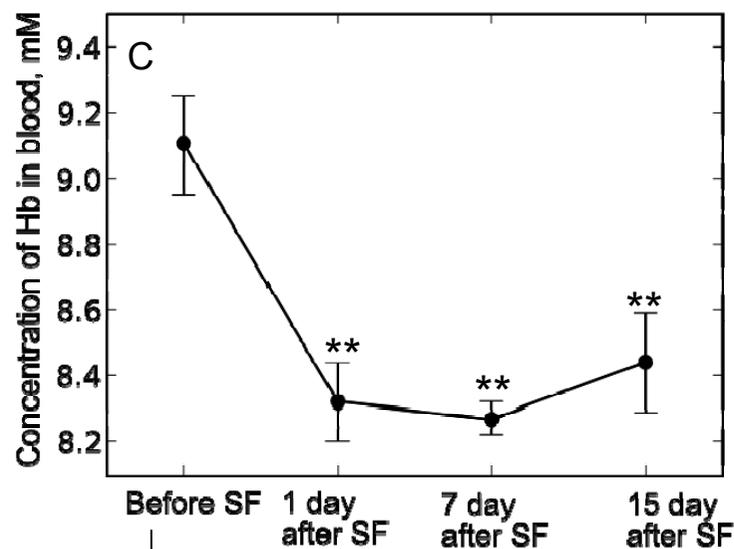


Космический полет меняет ойства гемоглобина человека

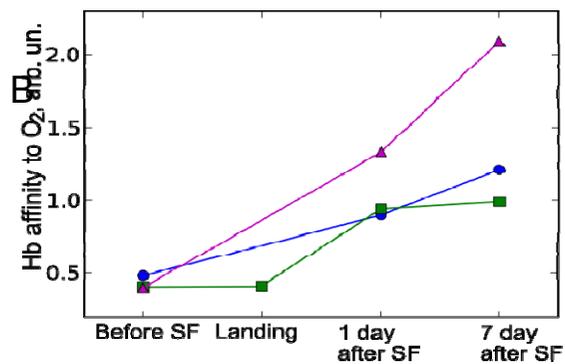
A. Содержание Hb-O₂.



C. Содержание Hb



B. Сродство Hb к O₂

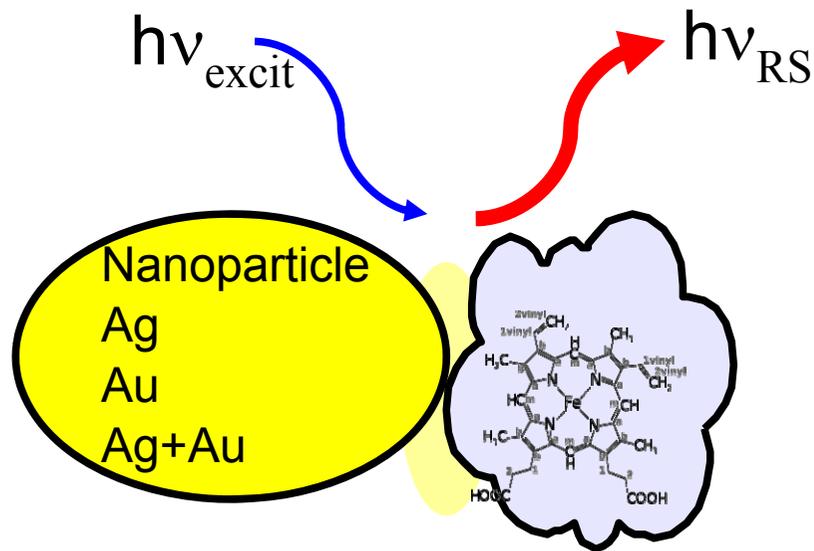


Снижение O₂ в ткани

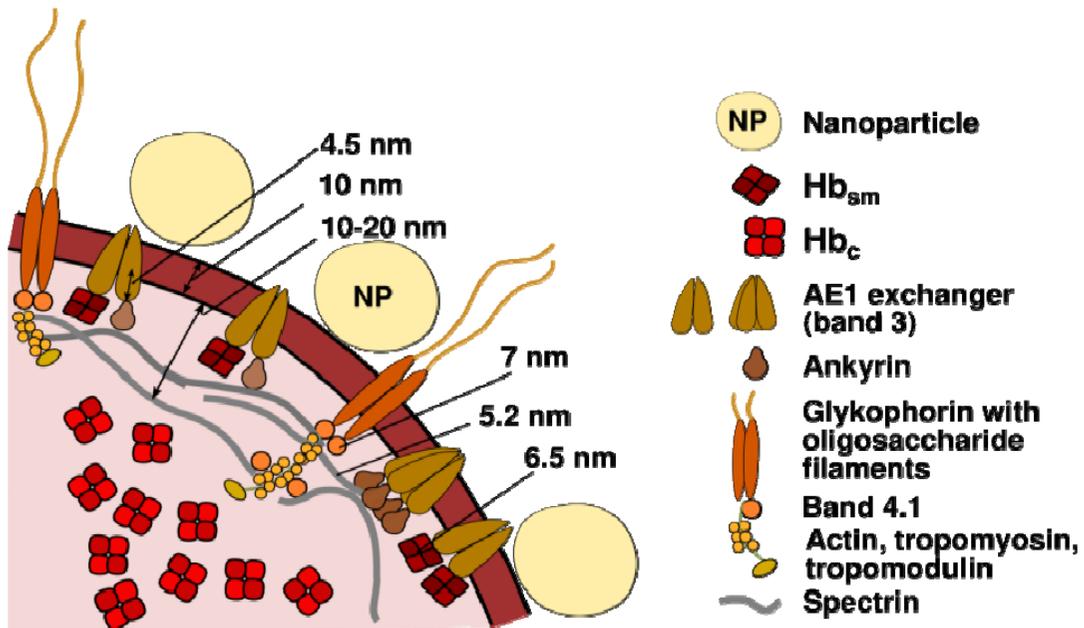
Тканевая гипоксия

Наночастицы и диагностика.

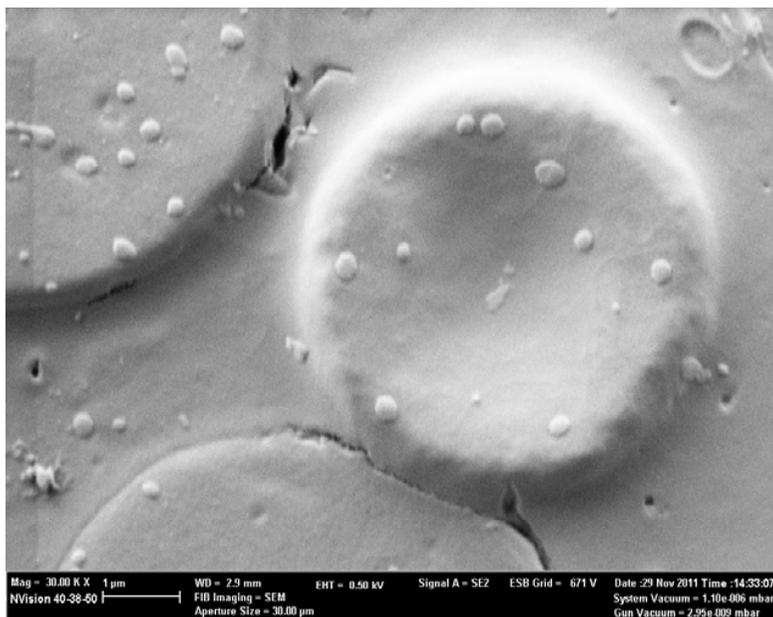
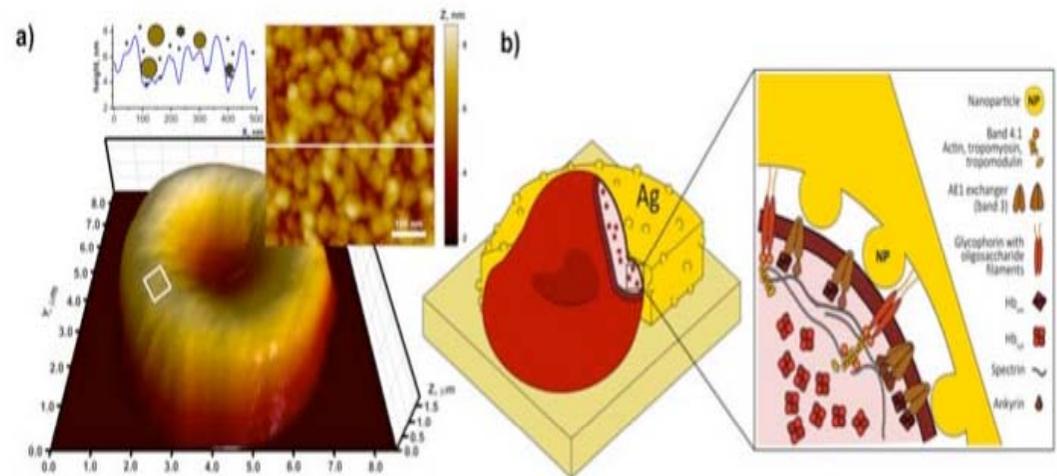
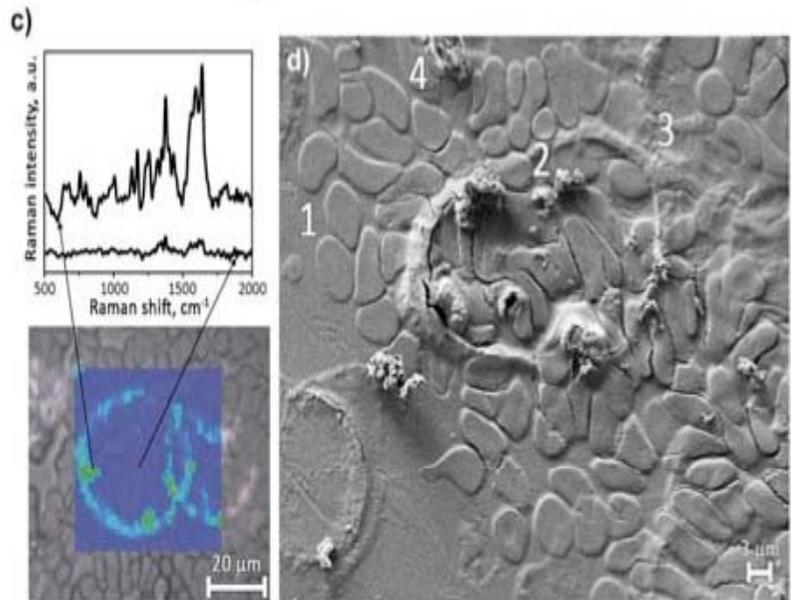
Усиление в миллион раз!



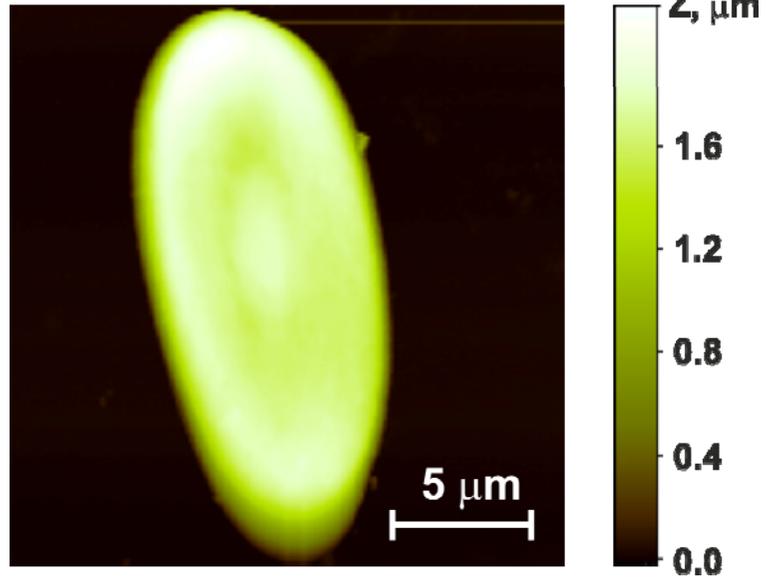
Использование
КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ
серебра и золота ПОЗВОЛИТ
ПОВЫСИТЬ ДИАГНОСТИКУ В
КЛИНИКЕ



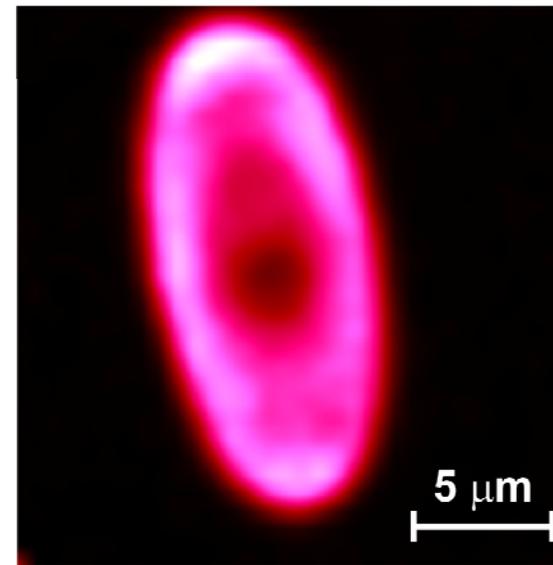
Коллоидные наночастицы серебра на поверхности эритроцита и наноподложки усиливают сигнал КР



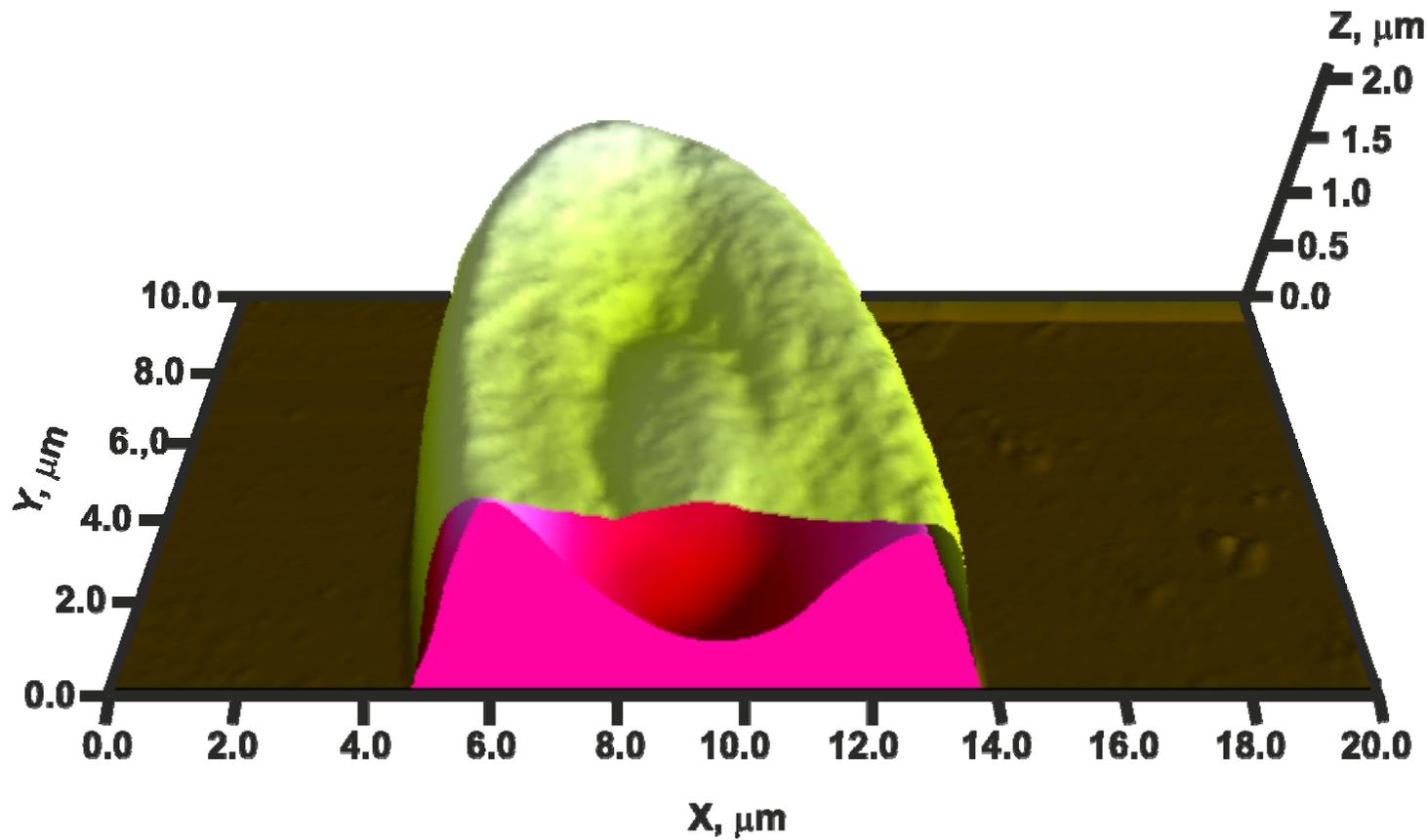
AFM image



local Raman Image



Each point of image is maximal value of spectra in range from 1541 till 1602 cm^{-1}



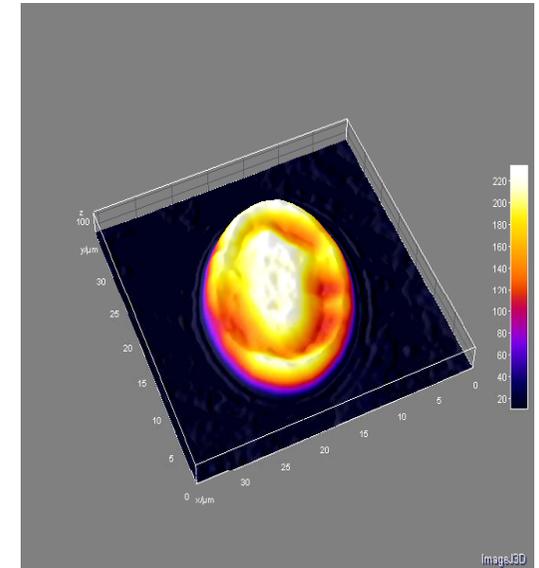
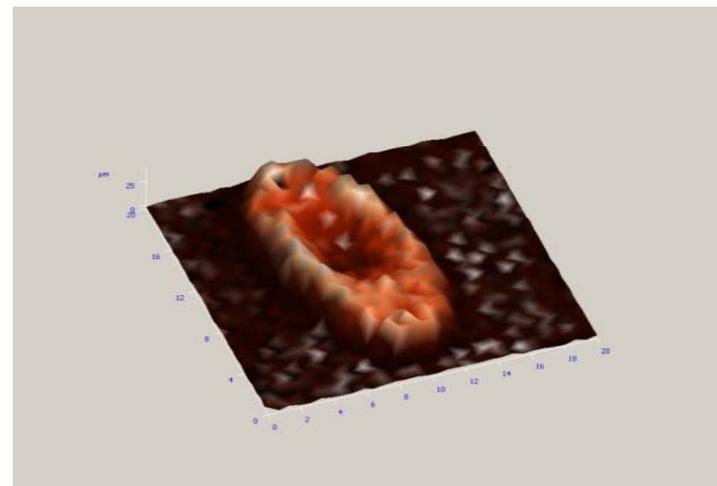
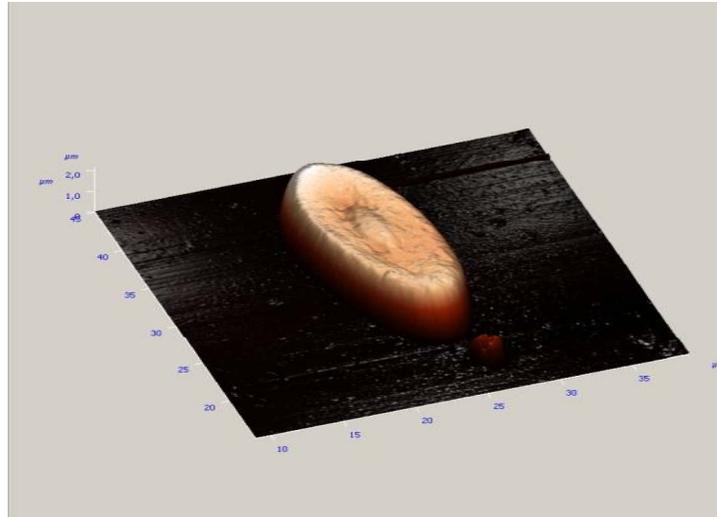
Диагностика по отдельной клетке?

Ядерный эритроцит: АСМ (а), ЛИМ (б), КР-микроскопия (в)

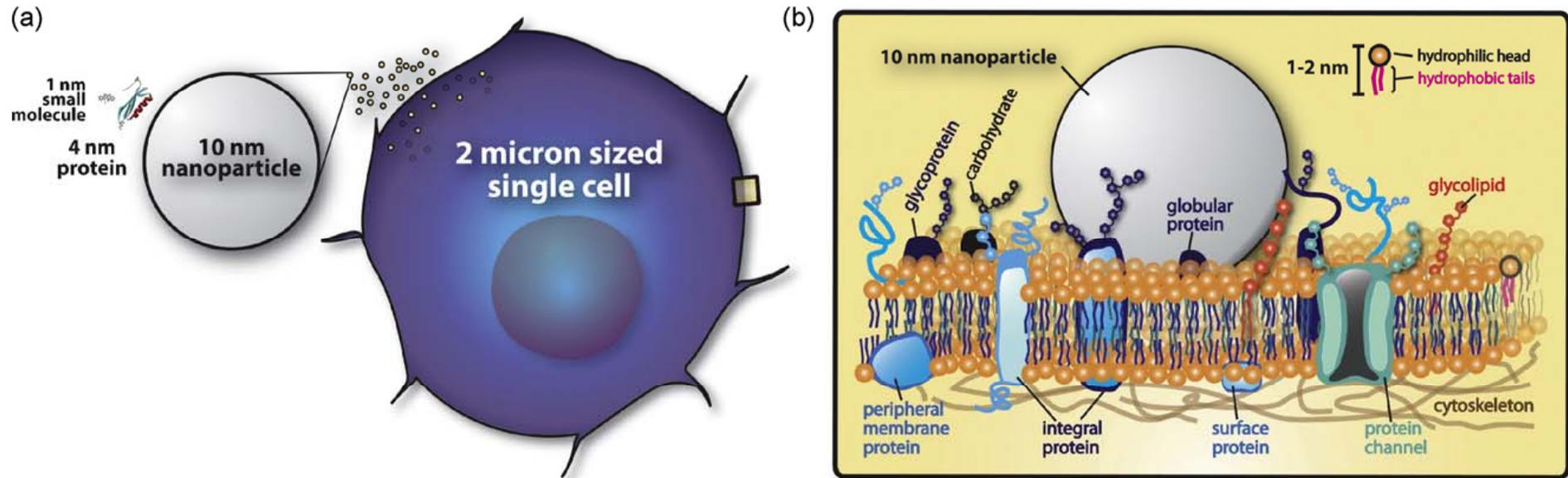


Комплекция для прозрачных образцов

- Высокое оптическое разрешение
- Максимальная эффективность сбора фотонов
- Работа в жидкости
- СБОМ
- Сканирование зондом и сканирование образцом (важно для TERS)
- Подходит для большей части коммерческих инвертированных микроскопов и спектрометров.

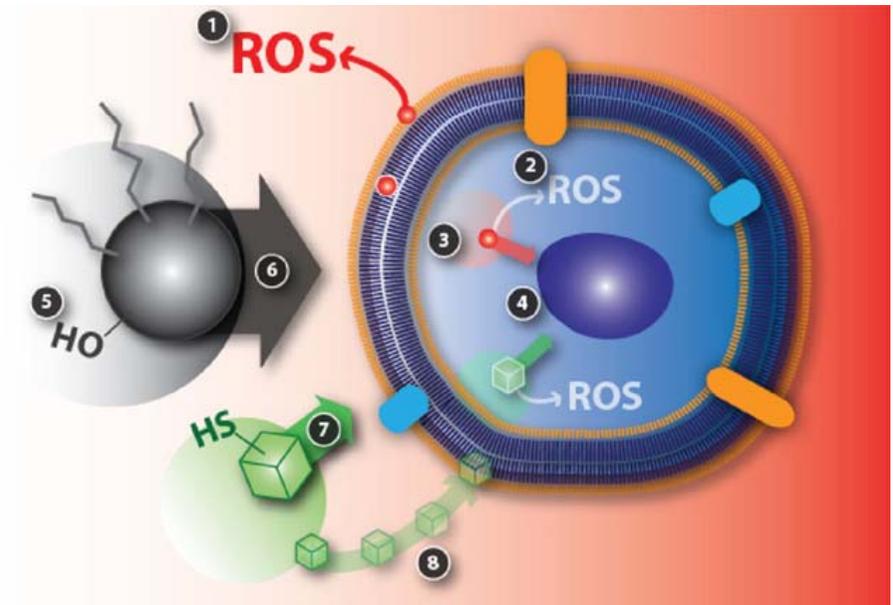


Размер имеет значение

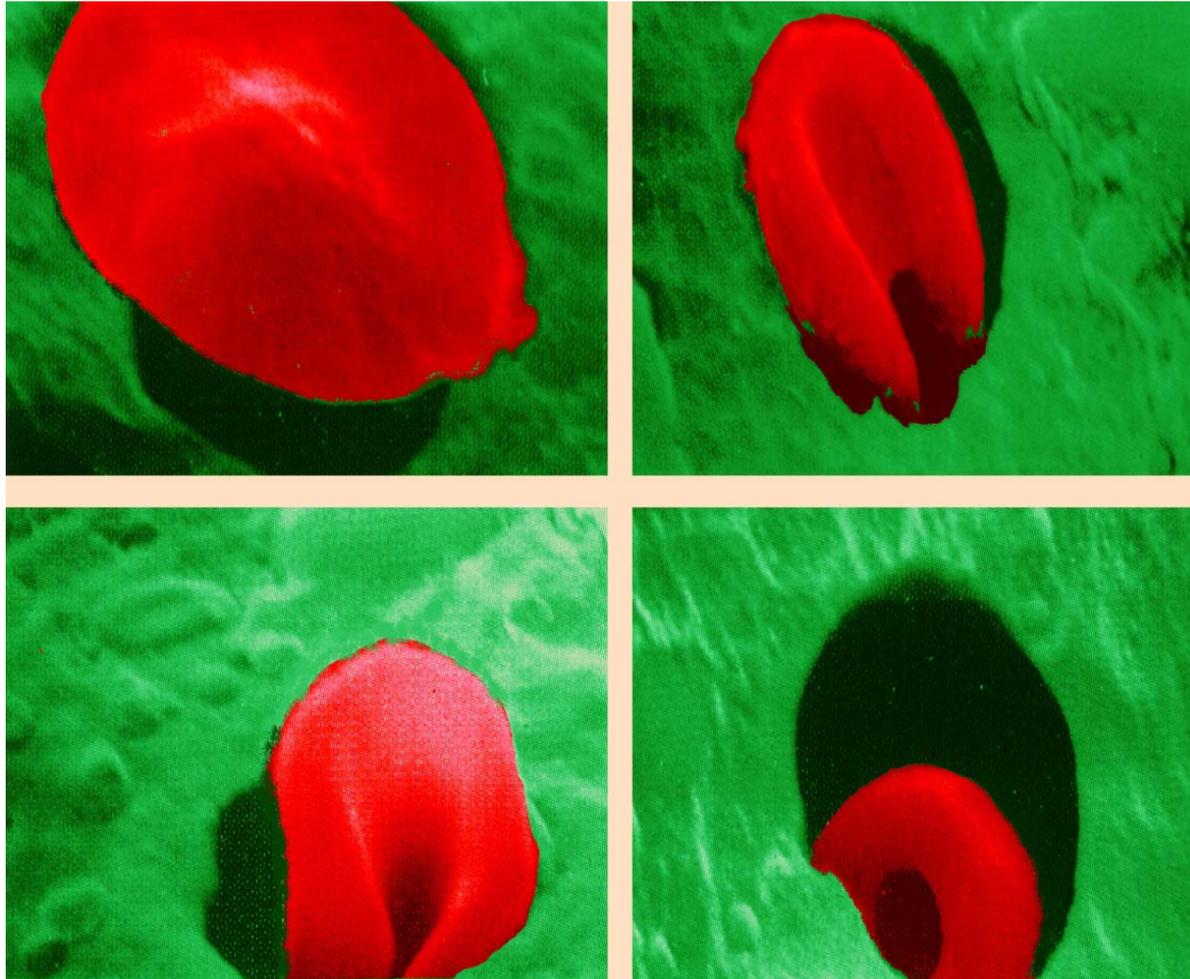


Механизмы повреждения

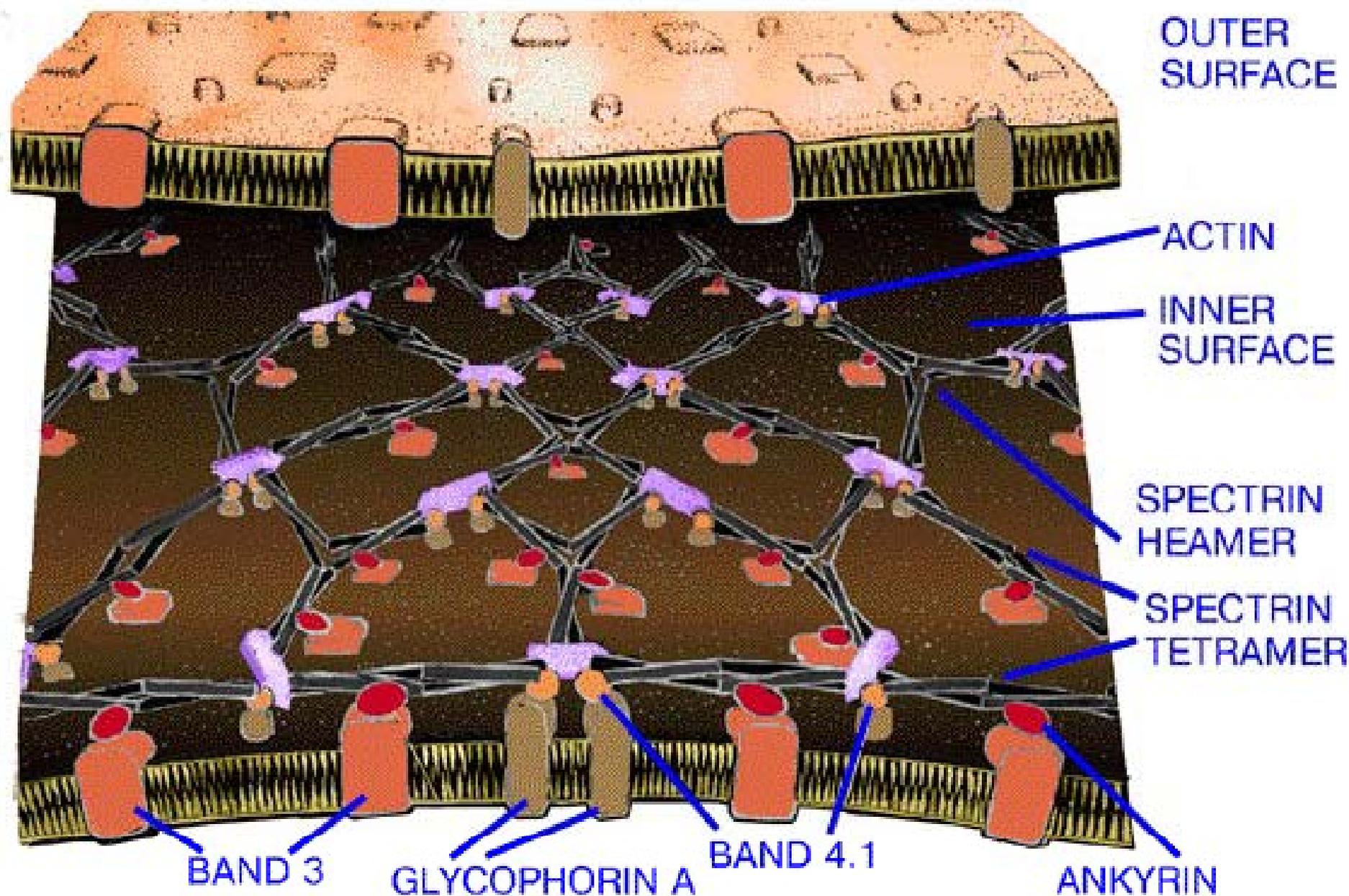
- Образование АФК
- Иммунные реакции
- Повреждение ДНК и мРНК
- Коагулирующий агент



Зачем нужно знать форму и
объем эритроцита?

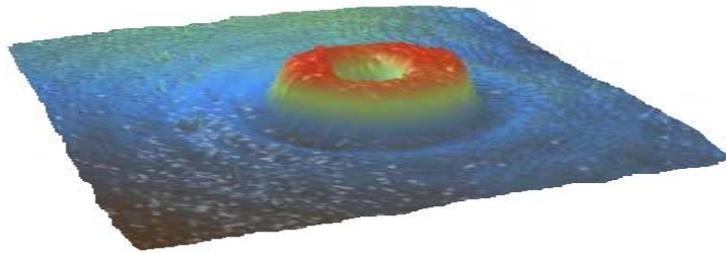


Цитоскелет эритроцита

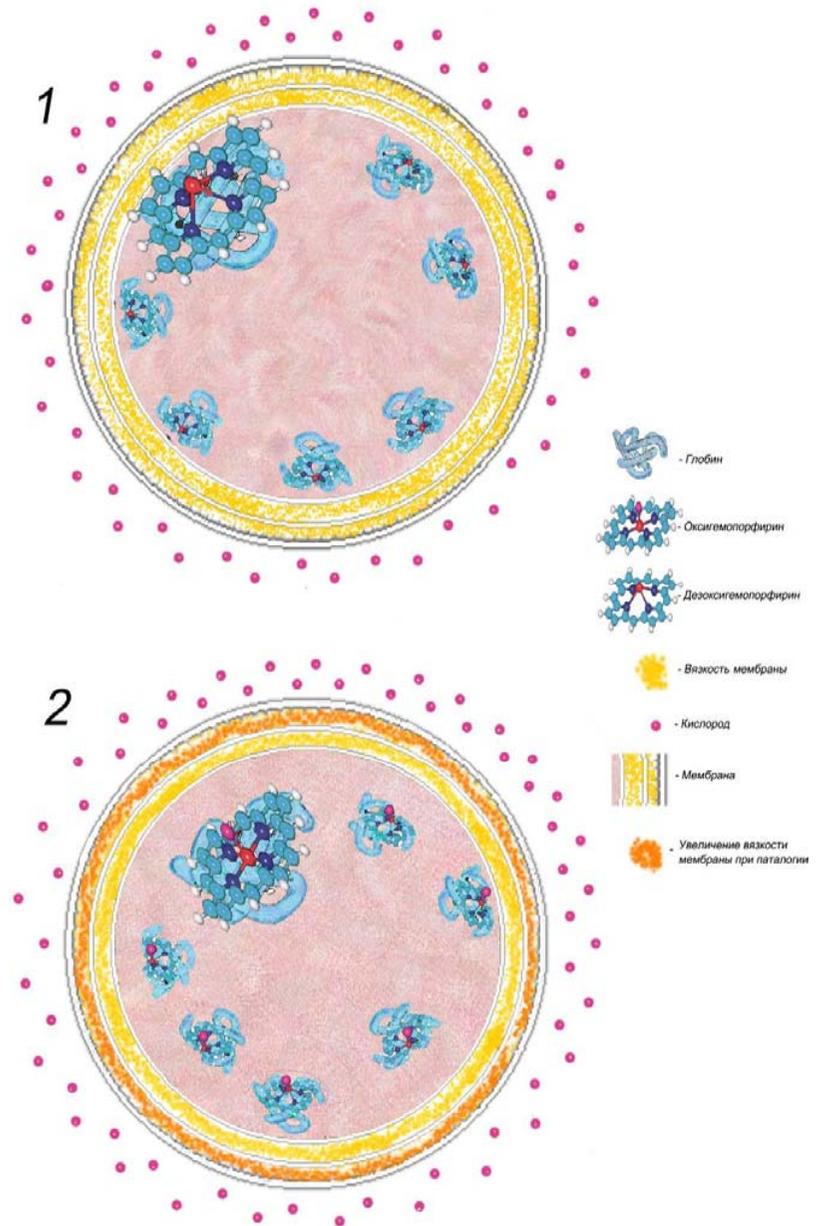
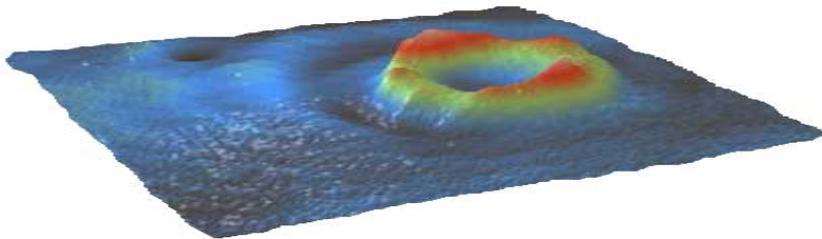


Распределение гемоглобина в эритроците в норме (А) и при патологии (Б)

А



Б



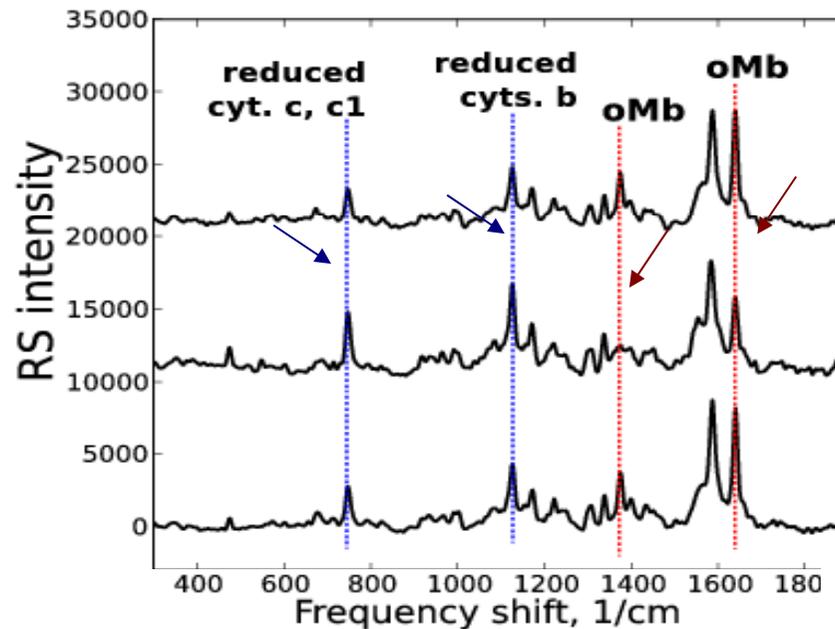
КР спектроскопия миоглобина и цитохромоксидазы митохондрий клеток сердца: ишемия и реперфузия

Основная идея: разработать подход, основанный на спектроскопии КР, для исследования функционального состояния митохондрий и эффективности кислородоснабжения клеток в живом сердце

Общая ишемия сердца

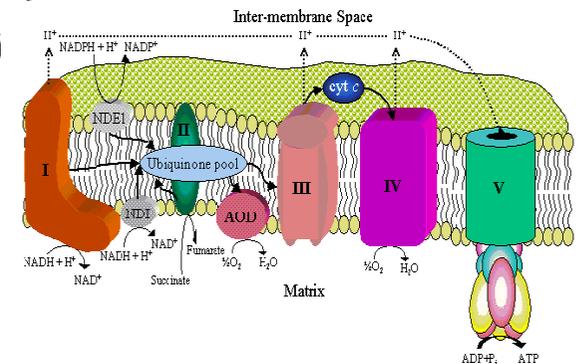


Локальная ишемия сердца



Спектры КР сердца крысы

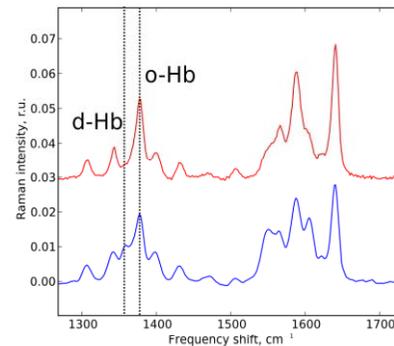
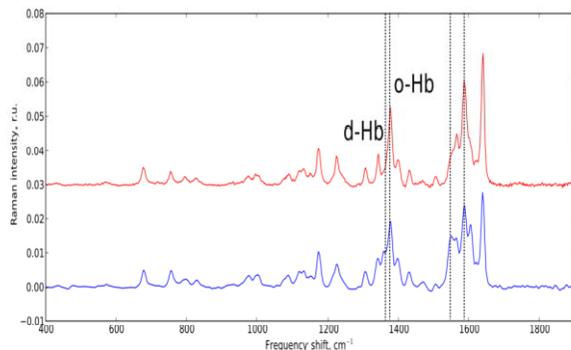
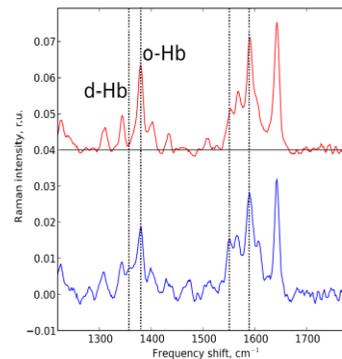
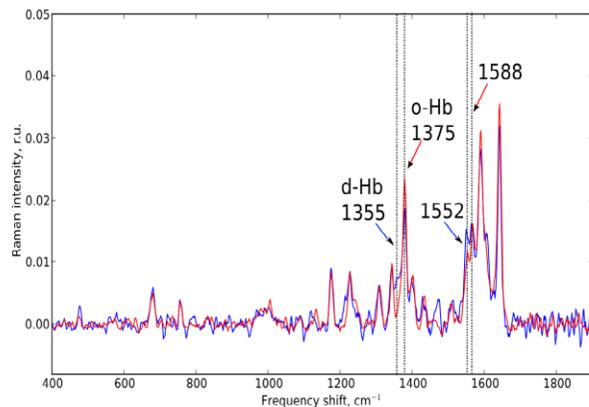
5 мин реперфузии
30 мин общей ишемии
Контроль



КР спектроскопия сосудов целого организма

спектроскопия сосудов мозжечка мозга (А) и соединительной ткани кишечника (Б) крысы

А. Спектры КР сосудов мозга крысы с диаметром (30-40 mm, **красный цвет** и 100-150 mm (**синий цвет**))



Полосы 1355 и 1375 cm^{-1} спектра КР зависят только от содержания д-Нб и о-Нб, соответственно

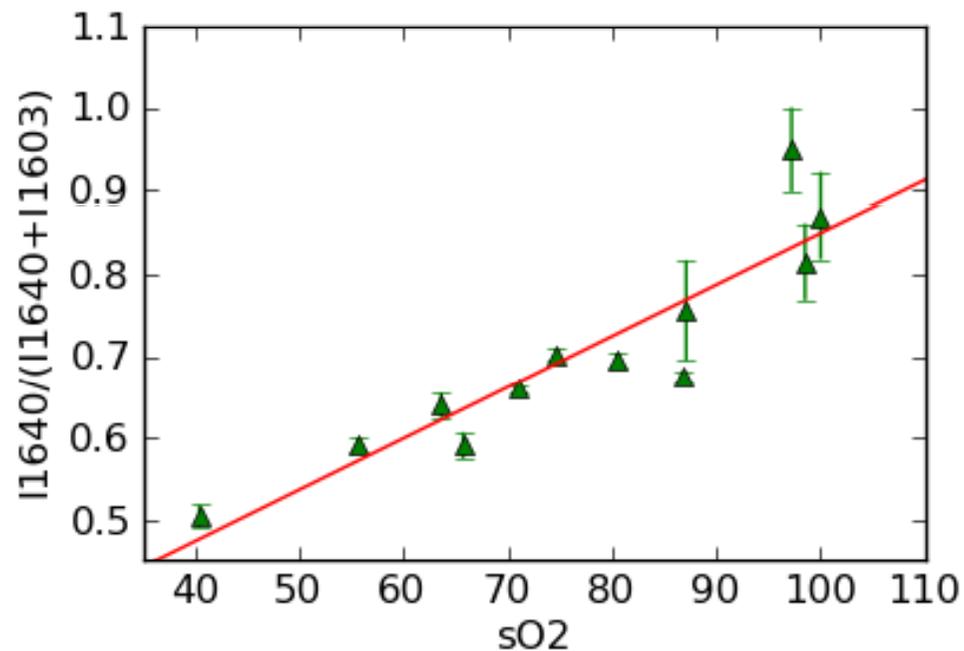
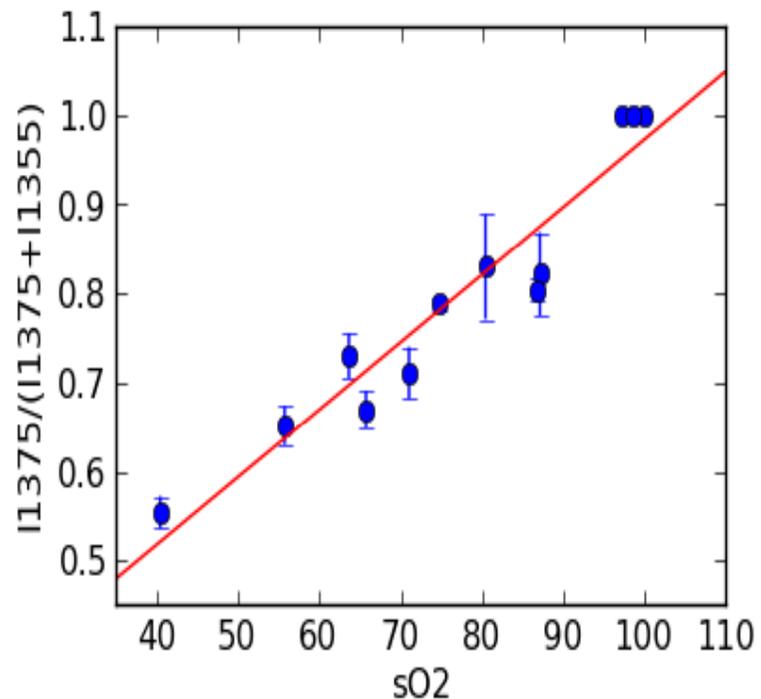
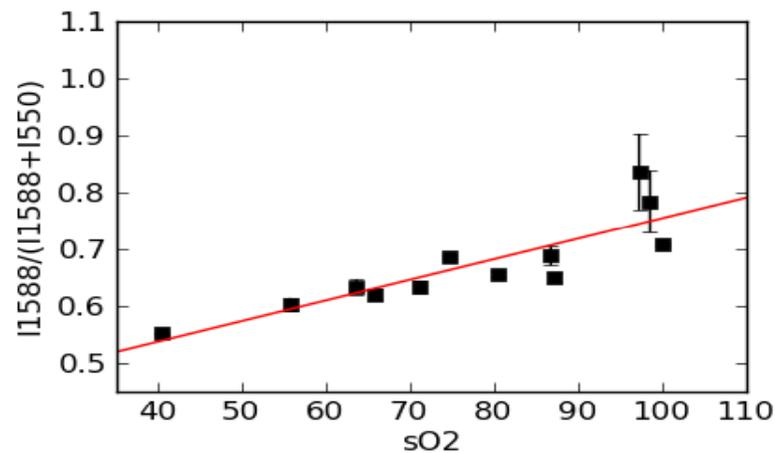
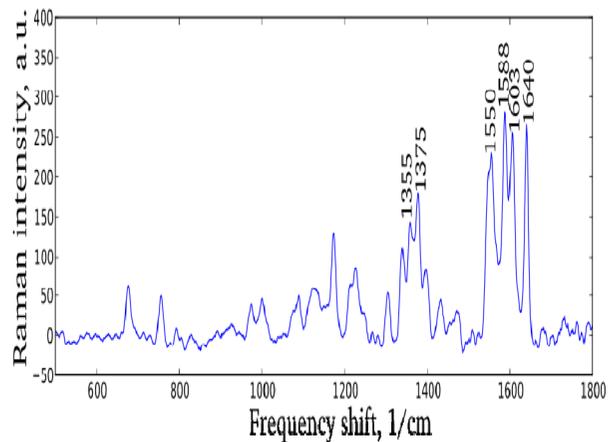
Полосы 1552 и 1588 cm^{-1} зависят как от содержания д-Нб и о-Нб, так и способности Нб связывать и сбрасывать O_2

Регистрация: диаметр участка $2.5\text{ }\mu$; время накопления 40 с

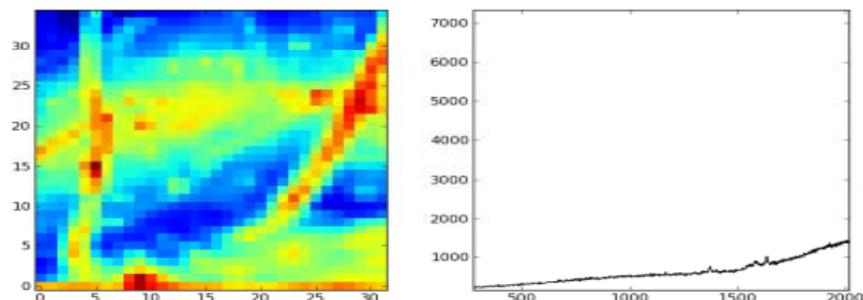
Б. артериолы (**красный цвет**) и вены (**синий цвет**)



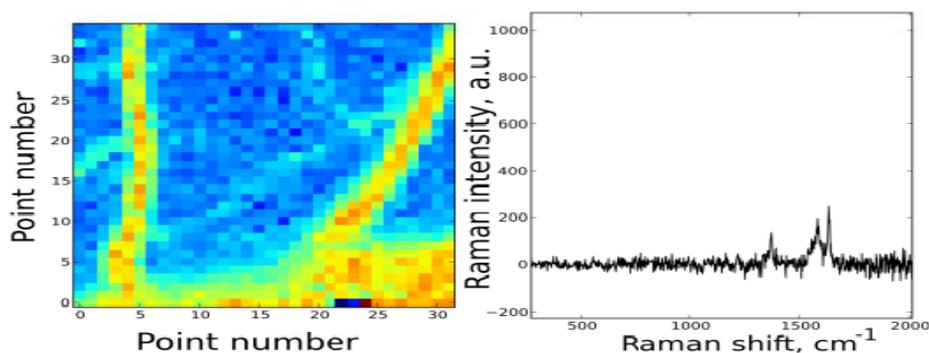
Мозг: количественная оценка оксигенации крови и сопоставление с нейрональной активностью



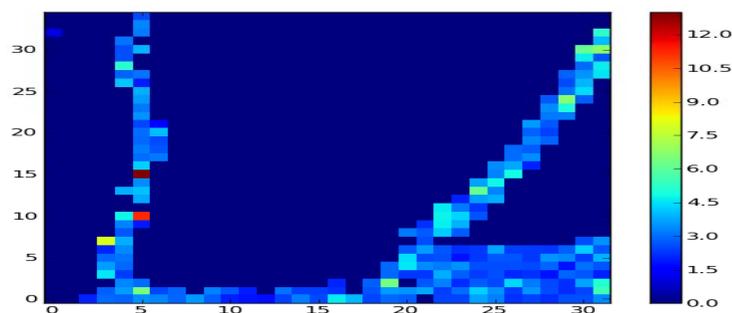
Визуализация сосудов с помощью КР спектроскопии гемопорфирина



Изображение получено при отсутствии коррекции каждой точки с базовой линией. Интенсивность в каждой точке равна сумме интенсивностей всего спектра. Объектив 5; Диаметр окна (step size) 10 μm . Время накопления- 15 с; число -31.



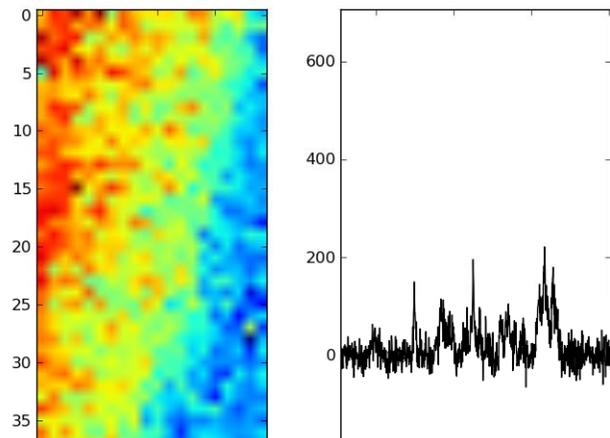
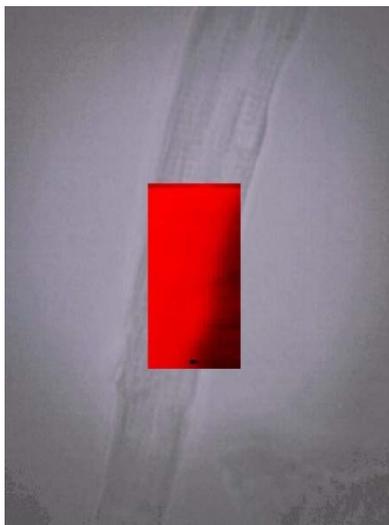
Изображение получено при коррекции каждой точки к базовой линии. Интенсивность в каждой точке равна сумме интенсивностей всего спектра. Объектив 5; Диаметр окна (step size) 10 μm . Время накопления- 15 с; число - 31.



Изображение получено при коррекции базовой линии и нормировке на содержание о-Нв. Интенсивность в каждой точке эквивалентно соотношению полос КР спектра $(I_{1365}-I_{1380})/(I_{1350}-I_{1360})$

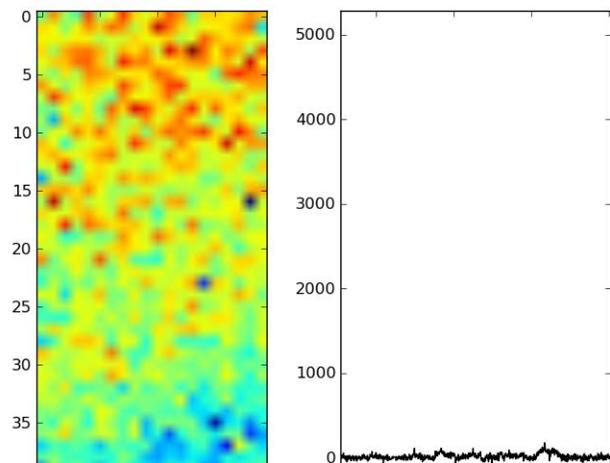
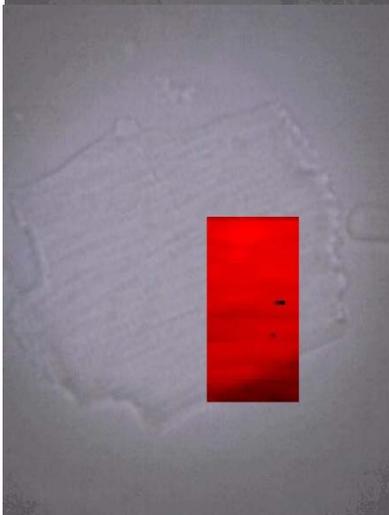


1



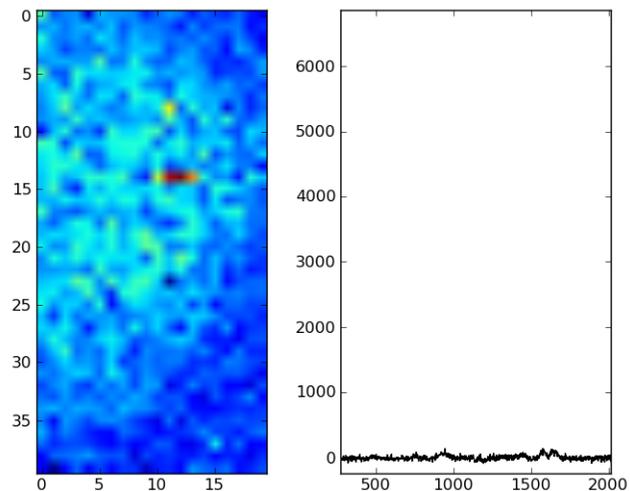
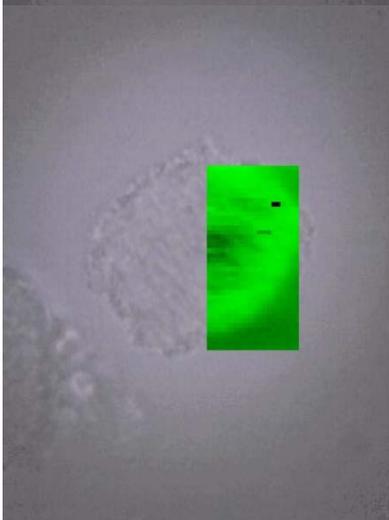
Фотографии и КР изображения разных типов кардиомиоцитов. КР изображение отображает суммарную интенсивность диапазона от 730 до 770 см⁻¹.

2



Объектив 63x; шаг 1 мкм; 40 (полос) x 20 (точек); 15 с – время снятия в каждой точке; 532 нм – длина волны возбуждения.

3



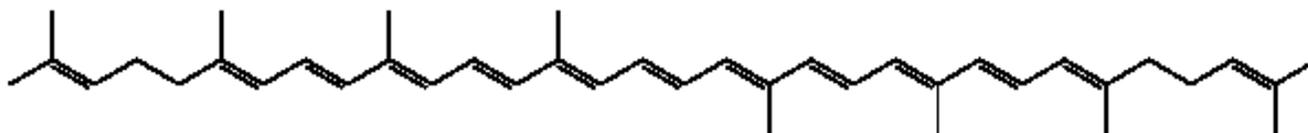
1 – палочковидная клетка
2 – квадратная клетка
3 – круглая клетка



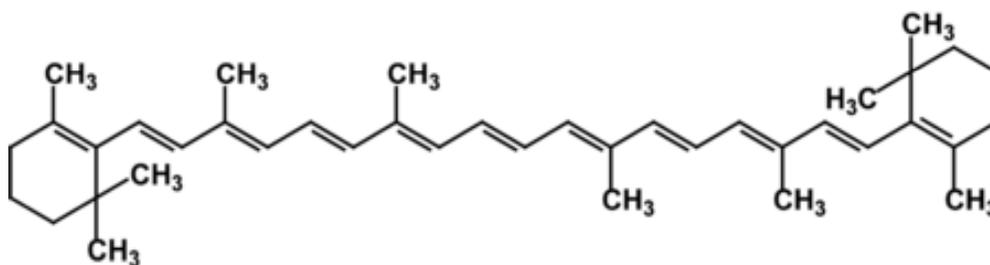
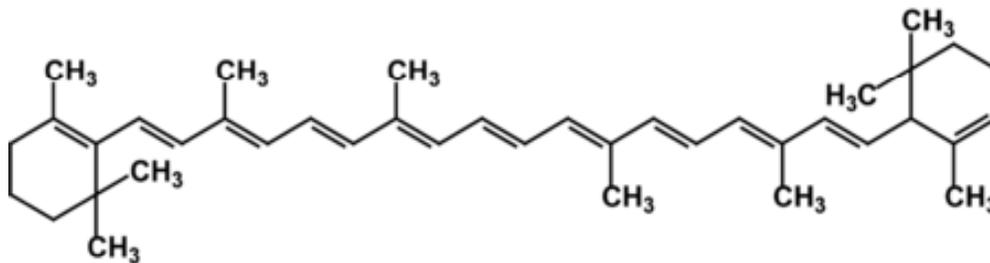
Другие случаи применения КР- спектроскопии

КР-спектроскопия каротинов ($C_{40}H_{56}$)

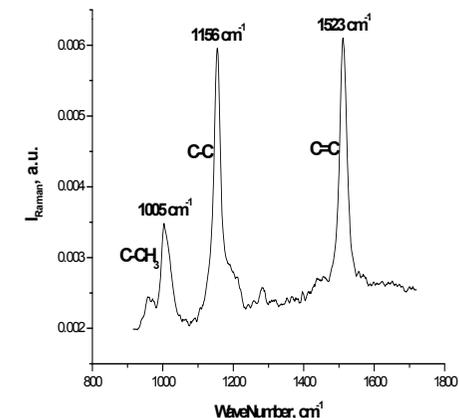
- Ликопин



- α -каротин



- β -каротин



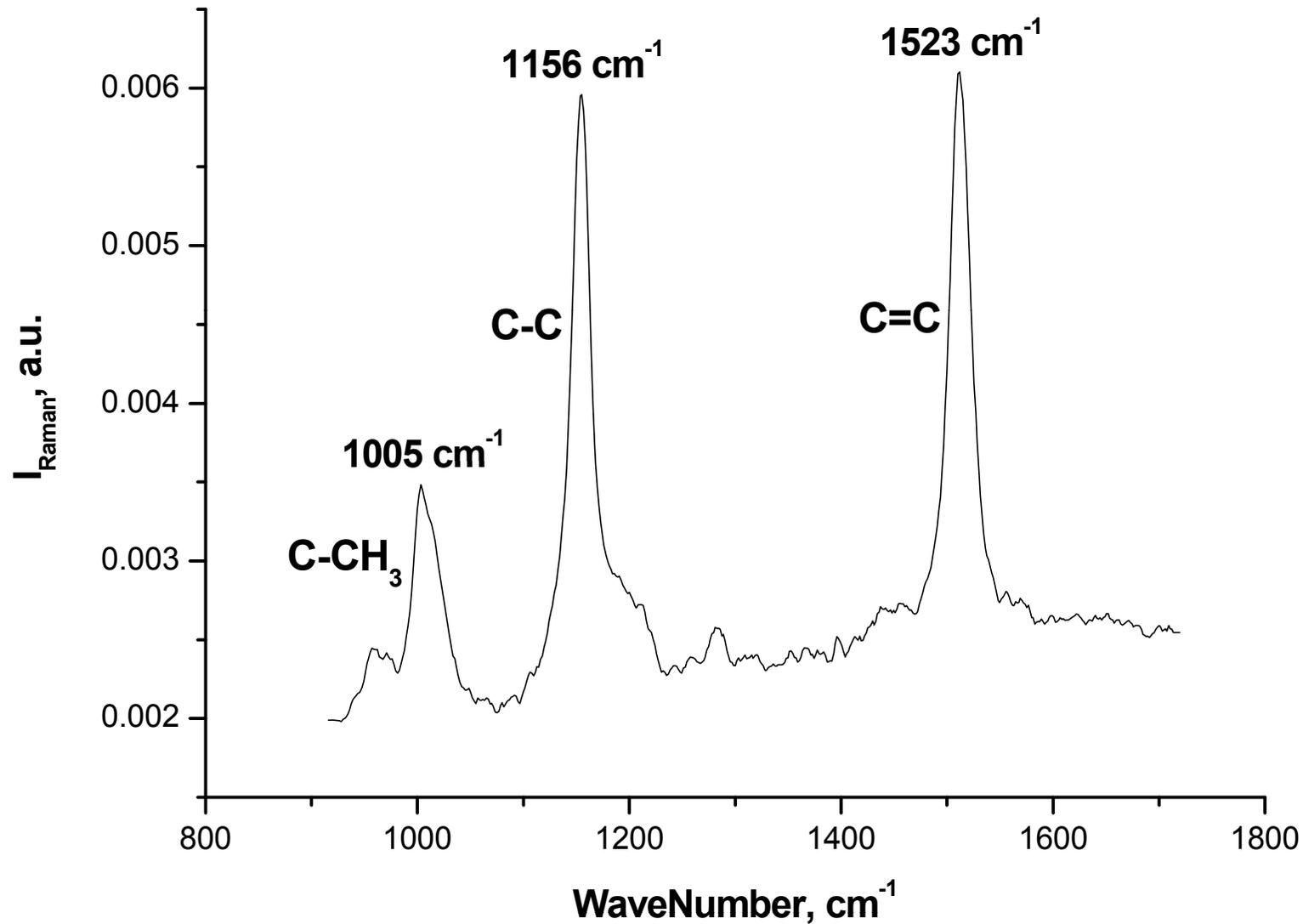
Каротиноиды -тетратерпены и тетратерпеноиды, производные ациклического предшественника — Ψ,Ψ -каротина (ликопина). К каротиноидам также относят каротины ($C_{40}H_{56}$), ксантофиллы (содержащие =O или –OH группу) и некоторые продукты циклизации и потери части углеродного скелета ликопина

- участие в регуляции *иммунологических процессов* (высокий уровень в плазме крови соответствует пониженной экспрессией факторов воспаления – IL8, MCP1, vCSPB, доказано участие в пролиферации Т-хелперов и т.д.)
- - участие *в регуляции функции эндотелия* (регуляция экспрессии факторов клеточной адгезии VCAM-1, ICAM-1; факторов пролиферации – PDGF; эндотелина-1 – экспериментальные работы на мышах, на культурах клеток).

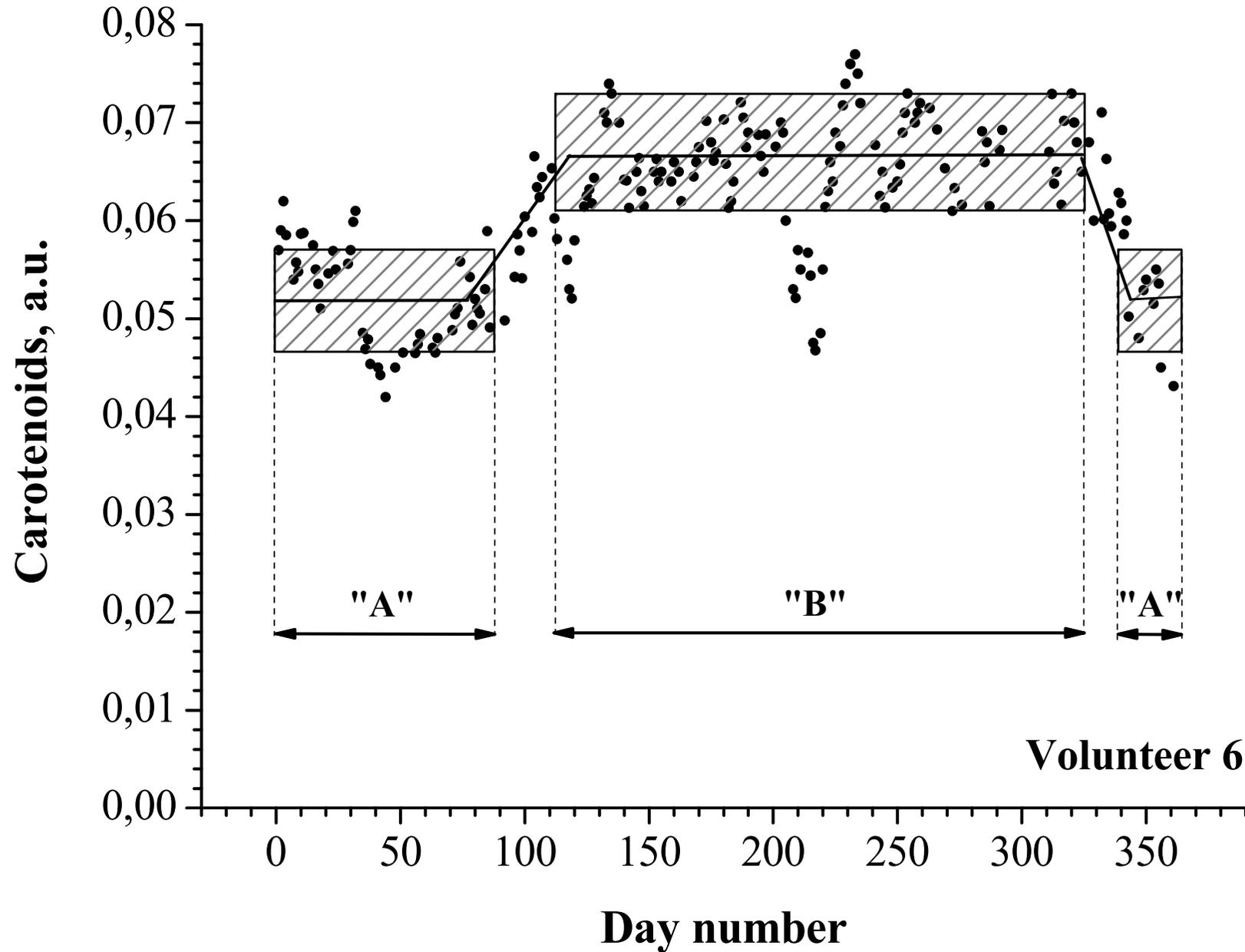
Исследования с заболеваемостью ССЗ

- CARDIA (с 1985г.) – установлена прямая зависимость между снижением содержания каротиноидов в плазме крови и заболеваемостью ССЗ.
- Third National Health&Nutrition Examination Survey (1988-1994гг.) – установлена обратная зависимость между концентрацией каротиноидов (ликопин, α -каротин) с общей смертностью и со смертностью от ССЗ.

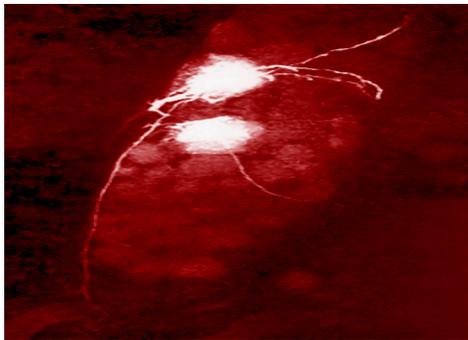
Typical Resonance Raman Spectrum of the Carotenoids after subtraction of fluorescence background



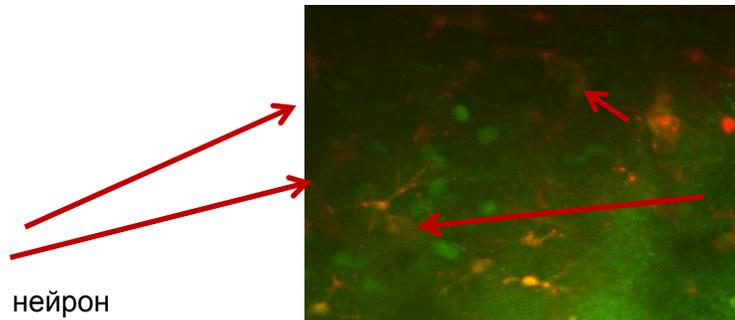
The carotenoid concentration in the skin during the course of one year



Природная и модельная сети нейронов



Флуоресцентное изображение ганглия (КЛСМ).
(краситель карбоцианин)

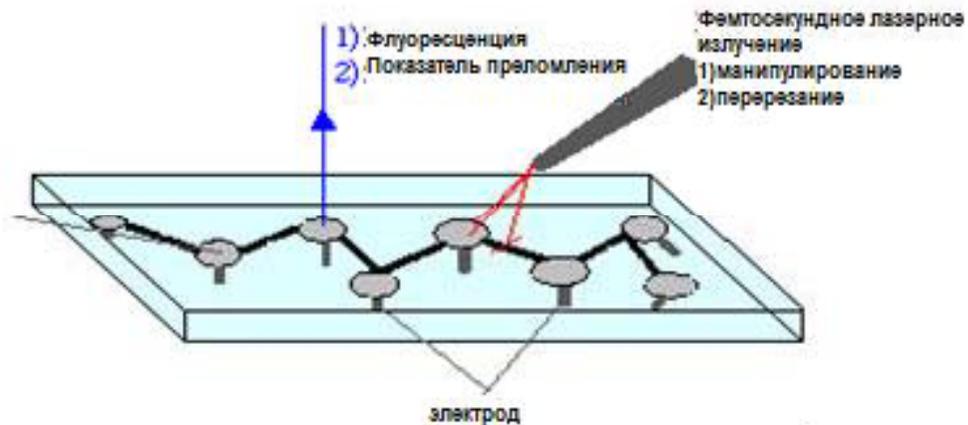


нейрон

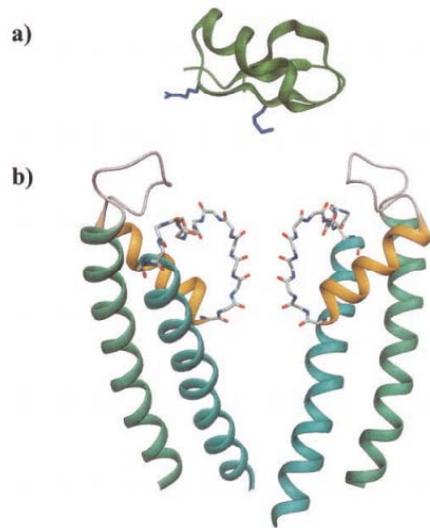
Кровяные
сосуды
астроциты

Изображение нейрональной сети (Двухфотонная флуоресцентная микроскопия)
краситель Oregon Green BAPTA and SR101 + dextrin
(Image from Martin Lauritzen's group)

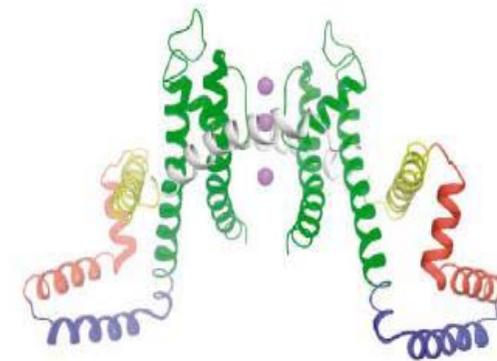
Исследование клеточных компартментов
1) комплекс (AGTx и CdTe)
2) наносенсор



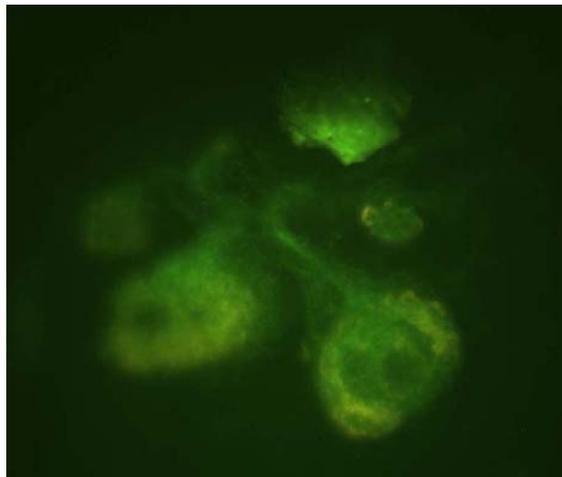
Структура K^+ - канала



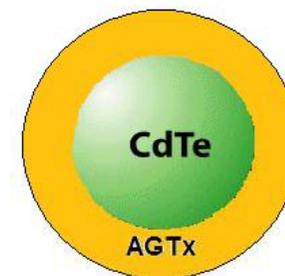
a) Структура блокатора агитоксина AGTX
b) Комплекс K^+ -канала с блокатором агитоксином



Структура потенциал-зависимого калиевого канала.
Сегменты субъединиц помечены цветом: S1-светло-голубой; S2-желтый; S3-красный; S4-темно-голубой; S5,S6- зеленый цвет.



Распределение K^+ - каналов, полученное с помощью квантовых точек CdTe

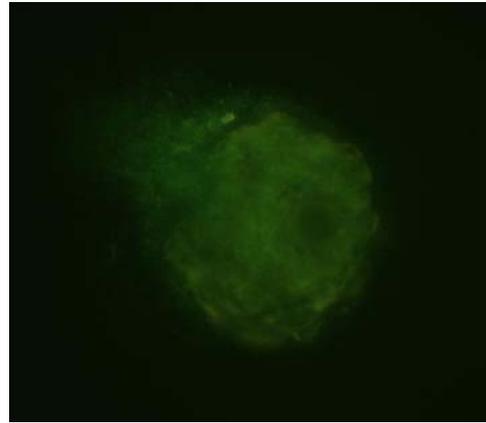


Комплекс блокатора агитоксина с квантовыми точками

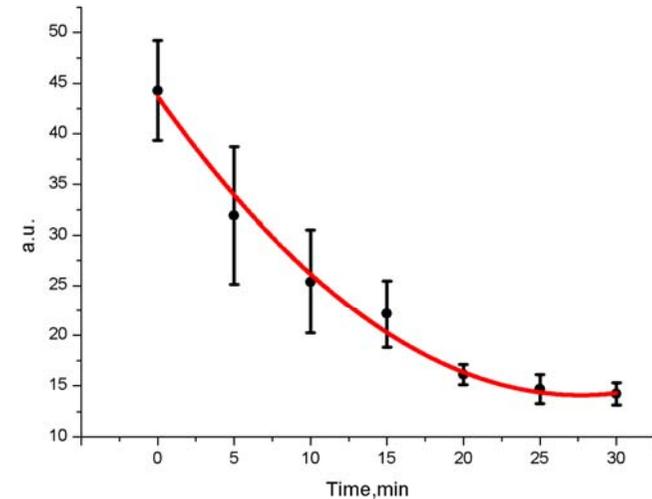
Комплекс AGTx and CdTe



Световое изображение изолированного нейрона(х40)



Флуоресцентное изображение нейрона
с комплексом (AGTx и CdTe)



Кинетика изменения флуоресценции квантовых точек при
замене AGTx на 4-АП

Флуоресцентные изображения нейрона с комплексом (AGTx и CdTe) после добавления 4-АП



После 5 минут



После 10 минут

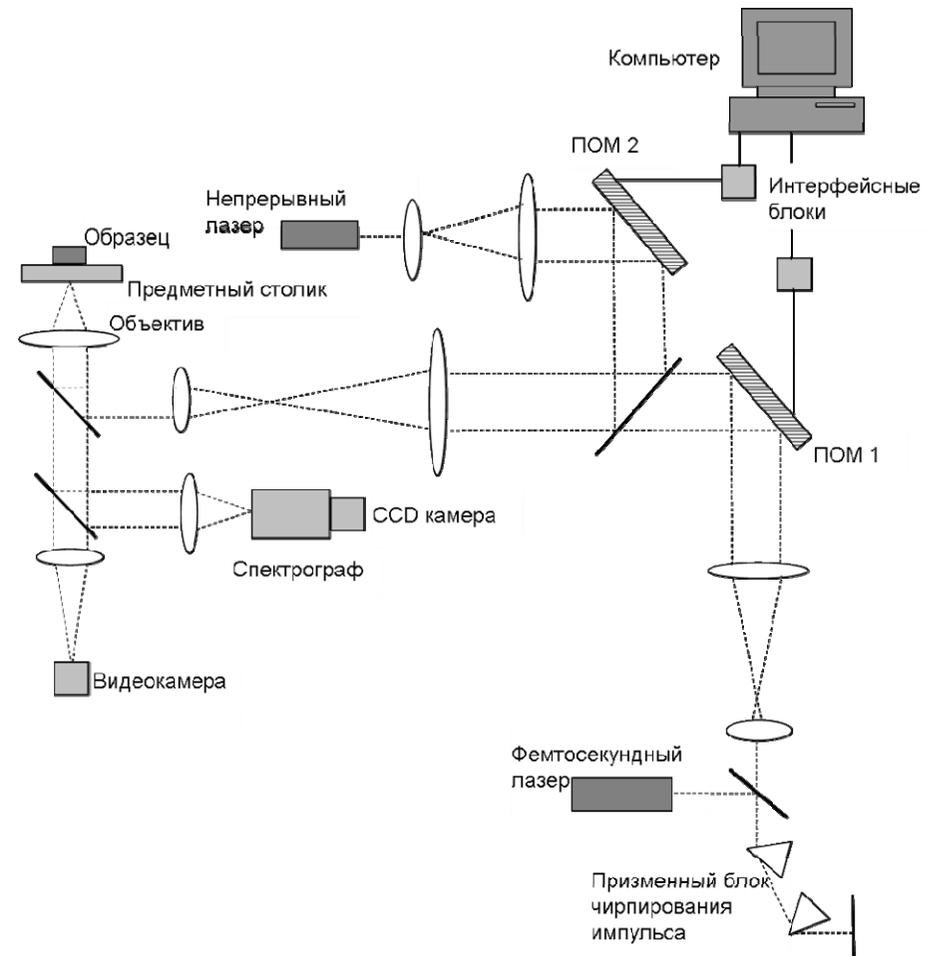


После 20 минут

Фемтосекундное лазерное излучение

- В сфокусированных лазерных пучках возможен оптический захват объектов, размер которых лежит в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких микрон.

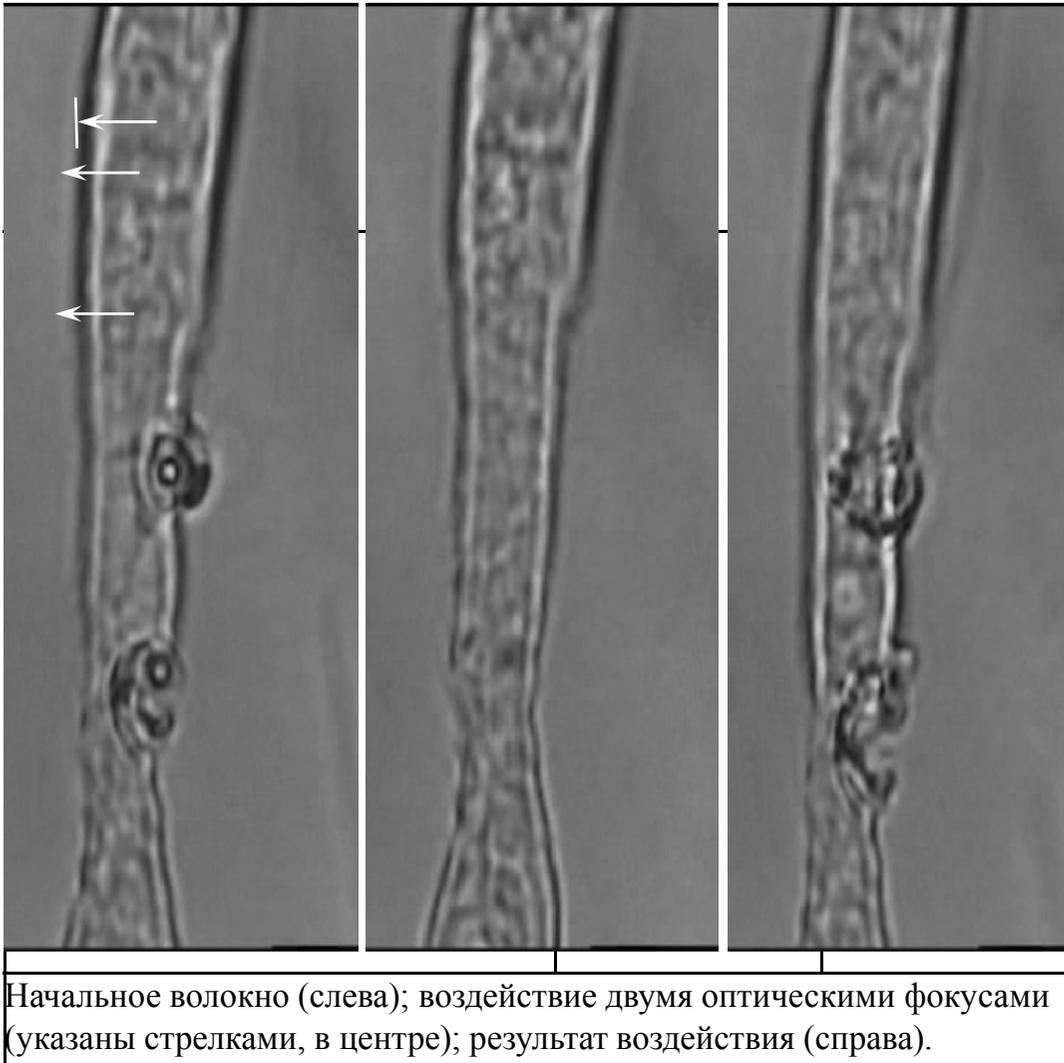
- При увеличении мощности лазерного излучения оптический «пинцет» можно использовать как скальпель

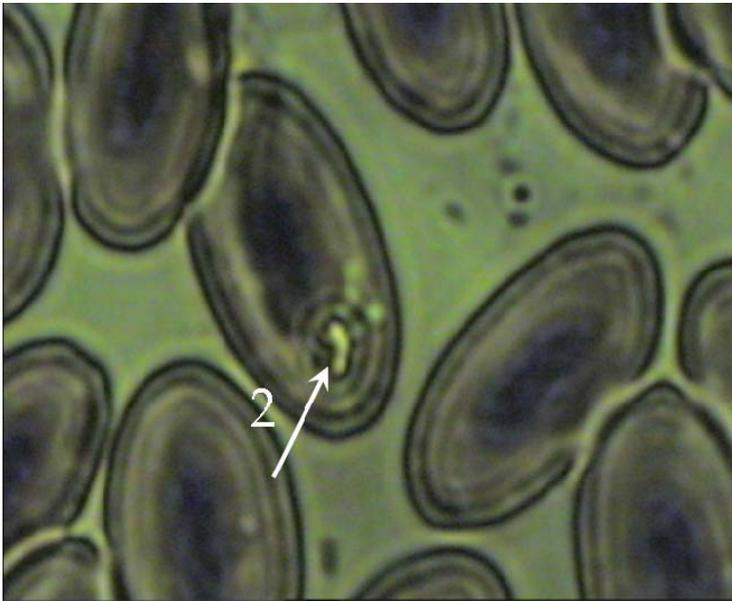
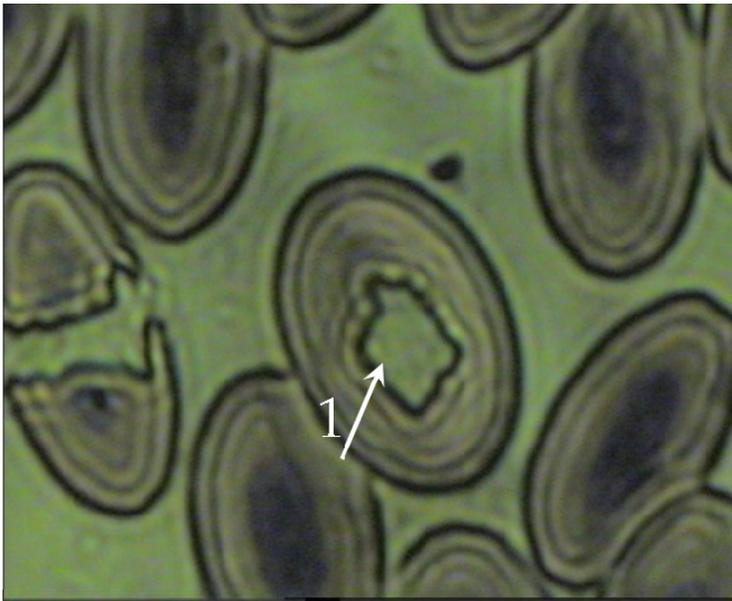


Микрохирургия нервного волокна.

Фемтосекундное лазерное излучение, длительность импульса составляла порядка 130фс, длина волны 800нм. Эксперименты проводились в два этапа:

1) начальное воздействие оптическим фокусом с энергией импульса 0,5 – 0,7 нДж (проводился «надрез»); 2) создавались два оптических фокуса при помощи SLM, для которых программа управления задавала траектории движения – в результате нескольких проходов фокусов поперёк нервного волокна образовывался разрез





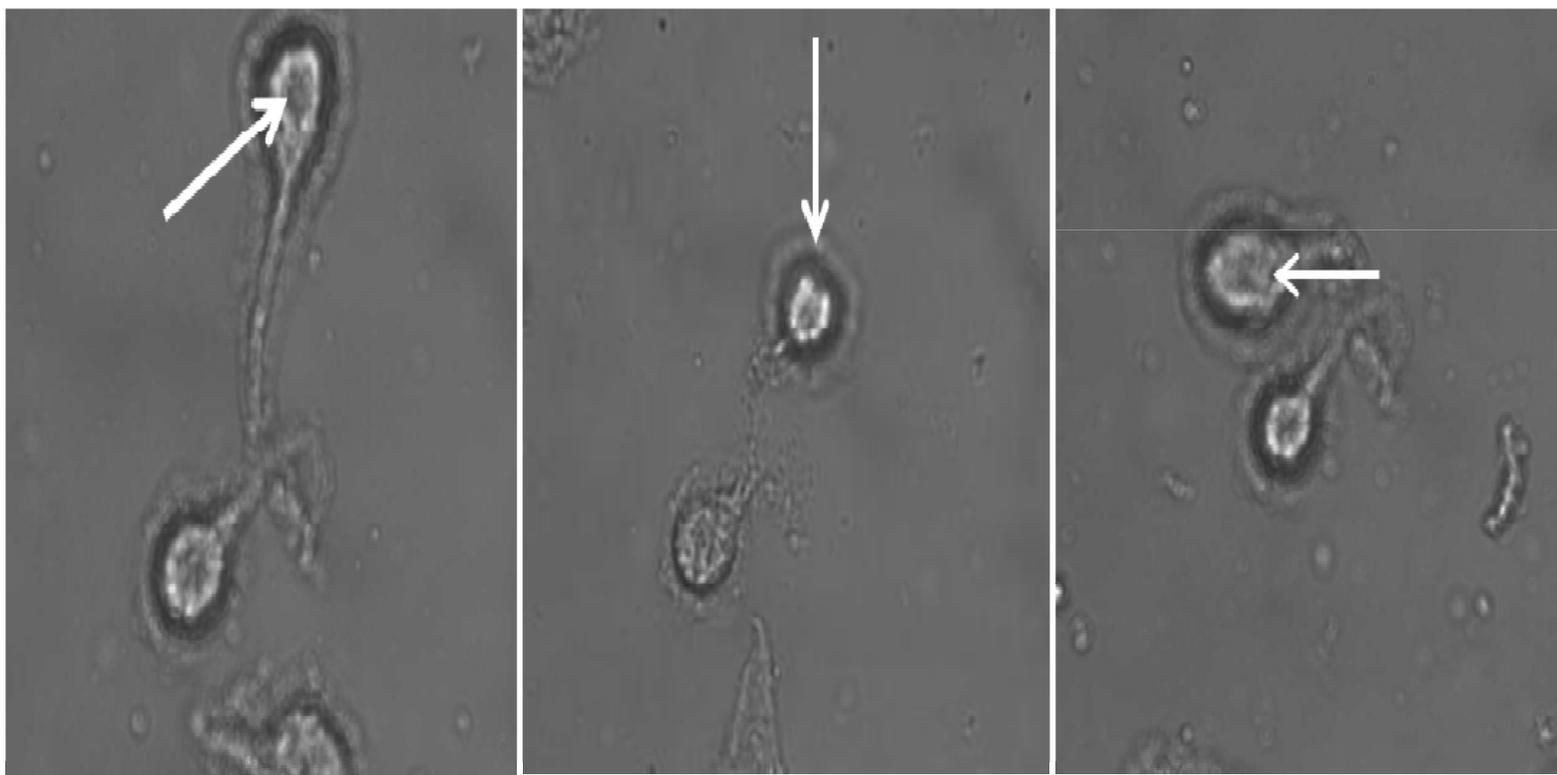
Микрохирургия клетки крови
Стрелками обозначены точки
воздействия лазерного
«скальпеля» (нумерация
проведена в порядке убывания
мощности лазера).

Р Представлены последовательные кадры видеозаписи,
полученной в ходе работы:

кадр 1 — начальное положение нейрона, стрелкой указано
место воздействия фемтосекундного лазера;

кадр 2 — смещение нейрона вниз;

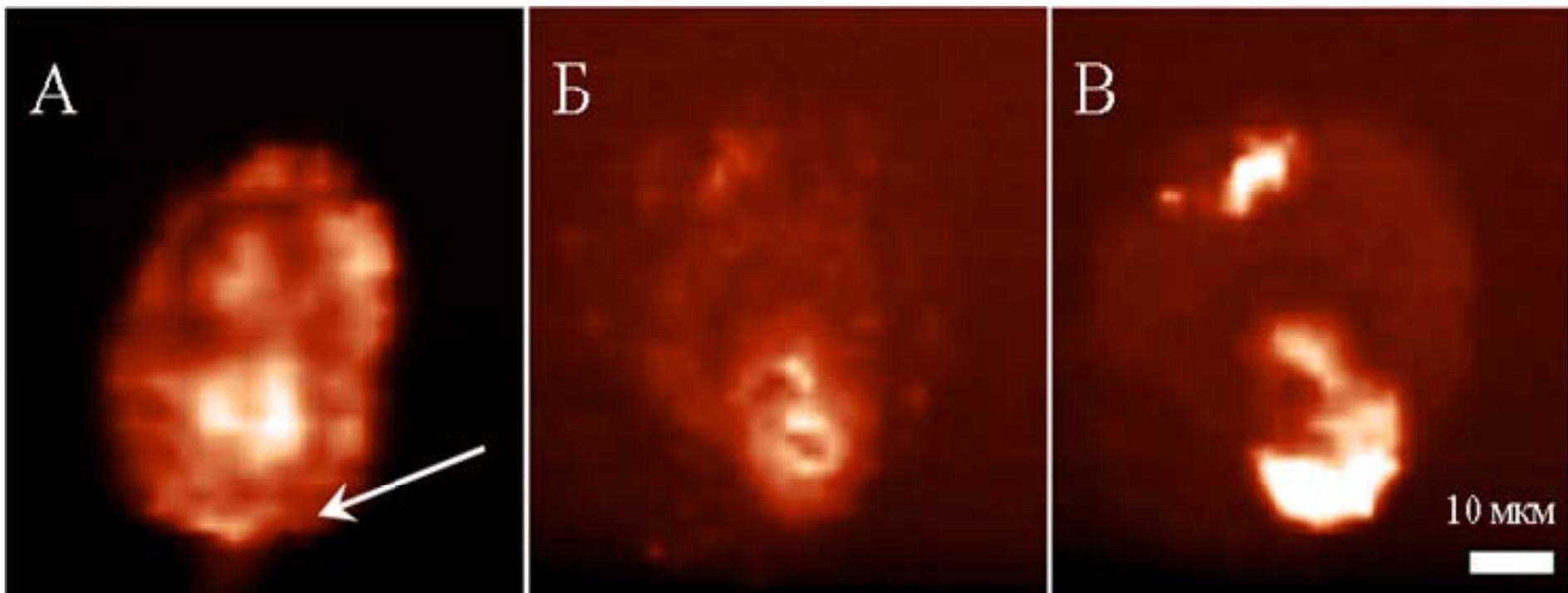
кадр 3 — смещение нейрона влево



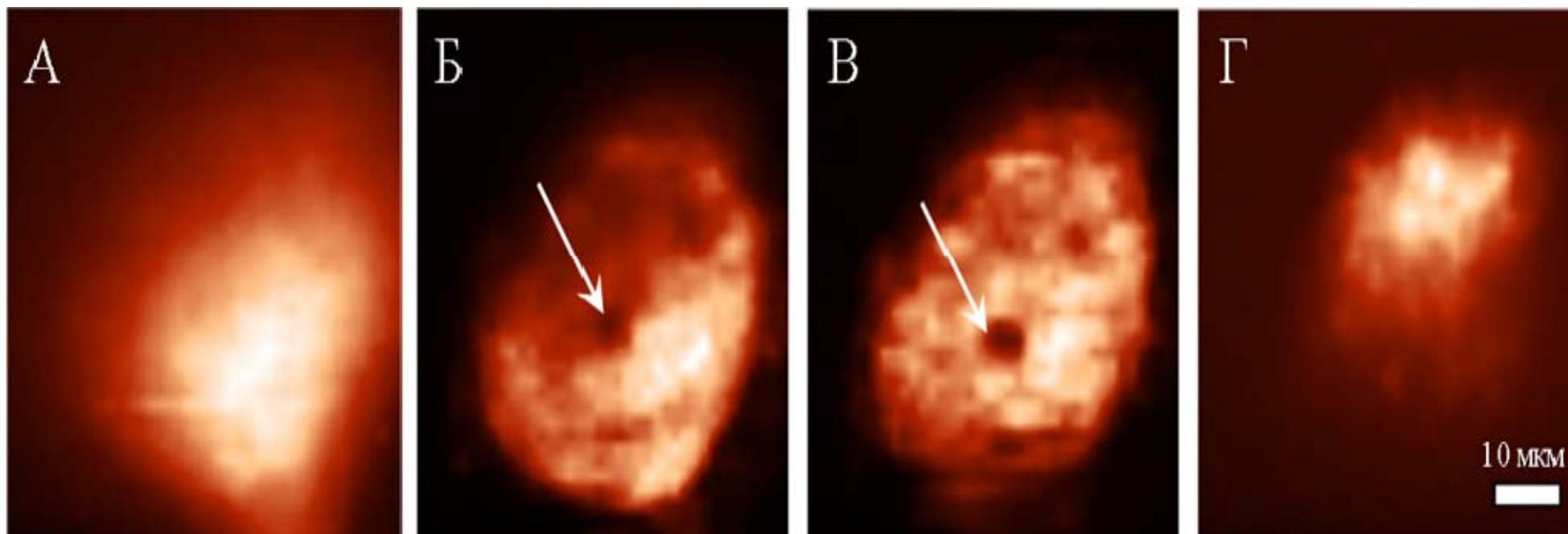
А. Флуоресцентное изображение нейрона в спектральном диапазоне 485-546нм, (флуоресцеин), стрелкой указана область, которая будет подвержена воздействию.

(Б) Флуоресцентное изображение нейрона после воздействия фемтосекундного лазерного излучения в спектральном диапазоне 485-546нм.

(В) Флуоресцентное изображение нейрона после воздействия фемтосекундного лазерного излучения в спектральном диапазоне 577-638нм



Последовательные (снизу кверху) оптические сечения по оси Z нейрона после воздействия ФЛИ, полученные методом флуоресцентной сканирующей микроскопии. Стрелками указана область воздействия.

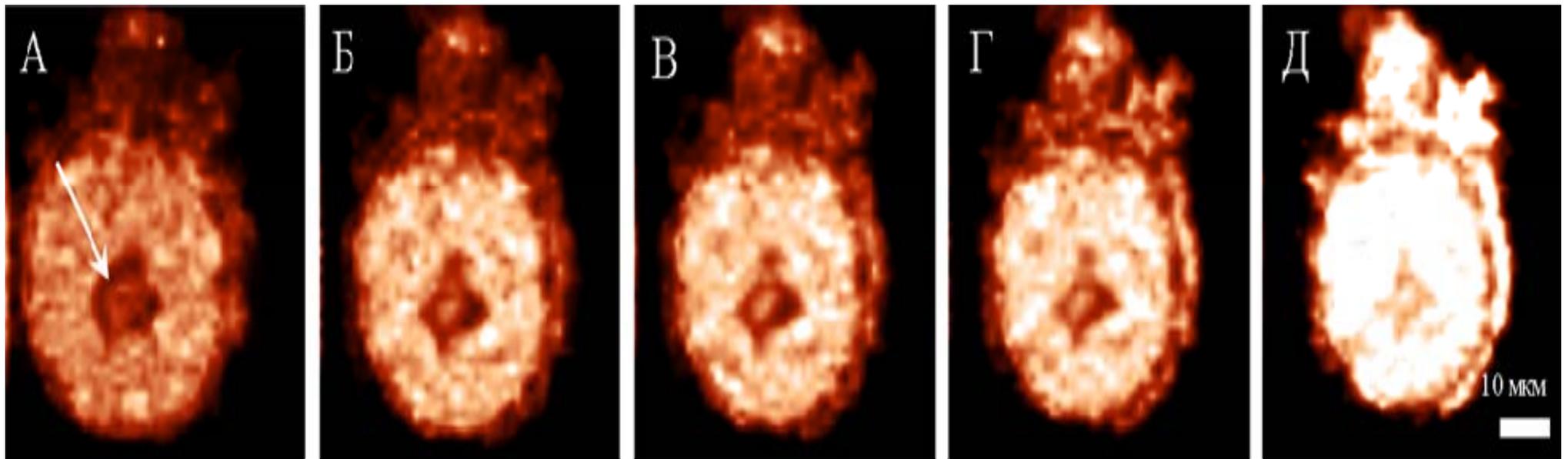


Флуоресцентное изображение нейрона в спектральном диапазоне 424-500нм, который соответствует флуоресценции зонда АНС.

(А) Нейрон до воздействия, стрелкой указана область, которая будет подвержена облучению;

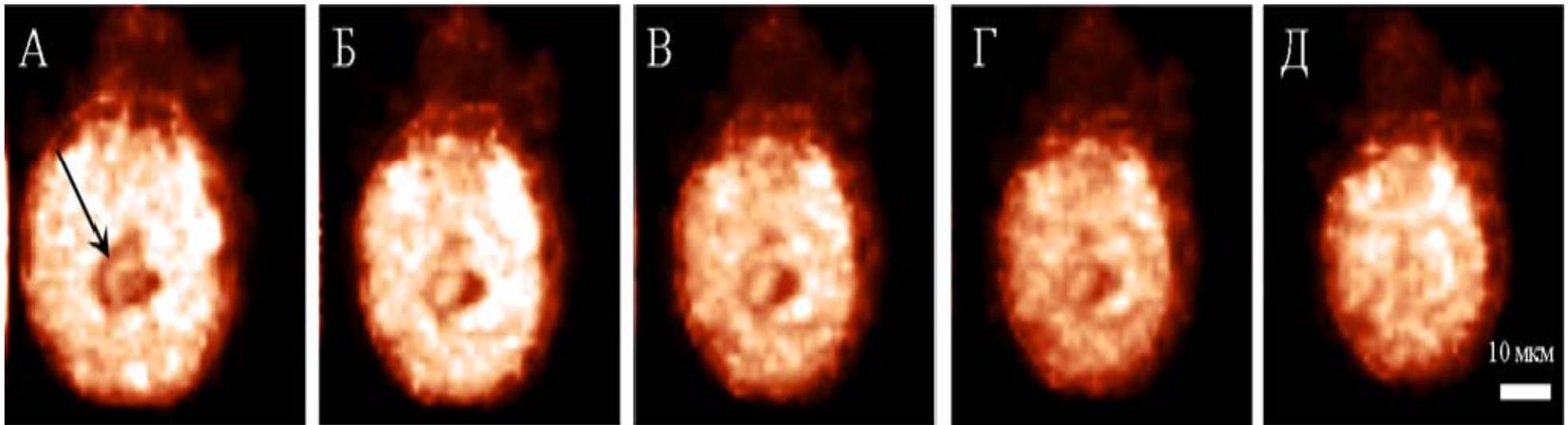
(Б)нейрон после облучения (5 минут);

(В)10 минут; (Г)15 минут; (Д)20 минут.



Флуоресцентное изображение нейрона в спектральном диапазоне 577-653нм, который соответствует флуоресценции зонда ДСП-12.

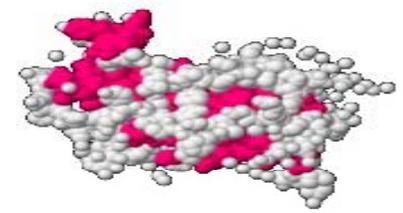
- (А) Нейрон до воздействия, стрелкой указана область, которая будет подвержена облучению;
(Б)нейрон после облучения (5 минут);
(В)10 минут; (Г)15 минут; (Д)20 минут



Оценка гипоксических эффектов и антиоксидантного статуса на фоне замещающей терапии у детей с соматотропной недостаточностью



СТГ представляет собой полипептид, состоящий из 191 аминокислотного остатка, молекулярная масса - 21 кДа, секретируется передней долей гипофиза. Благодаря действию ГР осуществляется линейный рост и рост внутренних органов, а также регуляция всех



Метаболические эффекты гормона роста

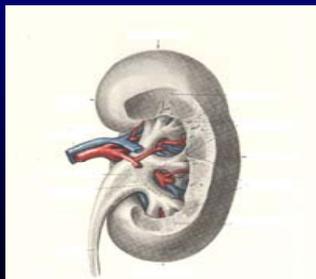
Костный метаболизм

- Обеспечение нормального роста и минерализации кости за счет прямого и опосредованного влияния на процессы ремоделирования



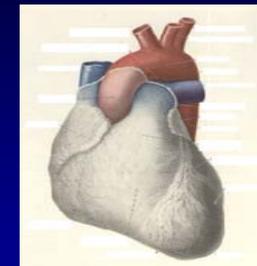
Почки

- Стимулирует все без исключения функции почек



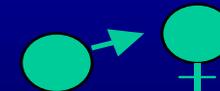
Мозг:

- Повышает проводимость первичного импульса;
- Повышает оперативную память;
- Повышает ассоциативное мышление и мотивацию



Сердечная и скелетная мускулатура:

- Повышает толщину миокарда сердца;
- Повышает фракцию выброса крови;
- Повышает мышечную массу и силу скелетных мышц;

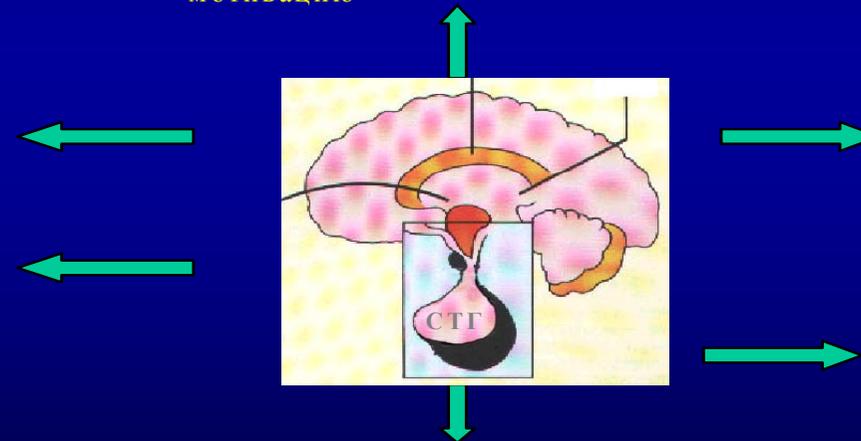


Репродуктивная система:

- Стимуляция развитие яичек и яичников;
- Стимулирует сперматогенез и оогенез

Иммунная функция

- Стимулирует объем и функцию тимуса и костного мозга;
- Стимулируют выработку антител ;
- Стимулирует активность фагоцитов;
- Повышает продукцию интерлейкина-2 и интерлейкина-6.



Мембранные белки
Регуляция объема
эритроцитов, формы and
pH

← Мембрана →

**Изменение морфологии
эритроцитов**



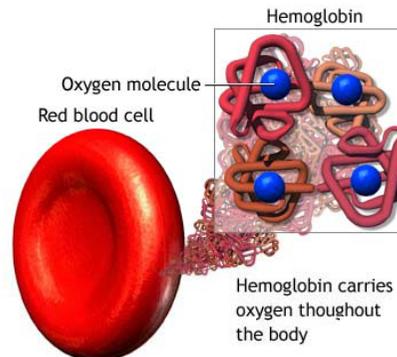
**Патология
эритроцитов как
клеточный уровень
гипоксии**

← Изменение
антиоксидантного
статуса плазмы и
крови



↓
Гемоглобин

← Изменение
конформации
гемоглобина и его
сродство к
кислороду



← **Генетические изменения**

← **Эффект внешних
модуляторов (NO, pH)**

При измерениях методом КР спектроскопии было установлено, что у пациентов достоверно уменьшилось содержание комплексов Hb-NO. Уменьшение доли NO способствует увеличению доли оксигемоглобина в крови, что и подтверждается экспериментально. Способность связывать гемоглобином лиганды уменьшилась, сродство гемоглобина к кислороду снизилось. Тенденция к увеличению доли оксигемоглобина, возможно, является некоторым адаптивным механизмом, направленным на сохранение кислорода в организме при уменьшении его количества в клетках.

Дети с соматотропной недостаточностью				Значения	
КР		Изменение показателя	Соотношение	До лечения	3 месяца
1)	Содержание оксиГБ	увеличение	7/3	0,57±0,16	0,66±0,14
2)	Сп-ть связывать лиганды	уменьшение	7/3	2,19±0,43	1,92±0,55
3)	Сп-ть связывать O2	уменьшение	9/2	3,13±1,226	2,32±0,70
4)	Сп-ть выделять O2	уменьшение	6/5	2,99±0,82	2,91±0,72
5)	Сродство Гб к O2	уменьшение	7/3	0,86±0,31	0,68±0,30
6)	Сродство без поправки на оксиГб	увеличение	7/4	1,11±0,36	1,32±0,36
7)	Сп-ть связывать NO	уменьшение	9/1	0,173±0,102	0,119±0,045

•- в качестве контроля выступала группа детей допубертатного периода с ЛОР-патологией:

- 0,370 – содержание оксигемоглобина,
- 2,736– способность гемоглобина связывать кислород,
- 2,258 – способность гемоглобина выделять кислород,
- 1,269– сродство гемоглобина к кислороду

...ЕЩЕ И СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО?!

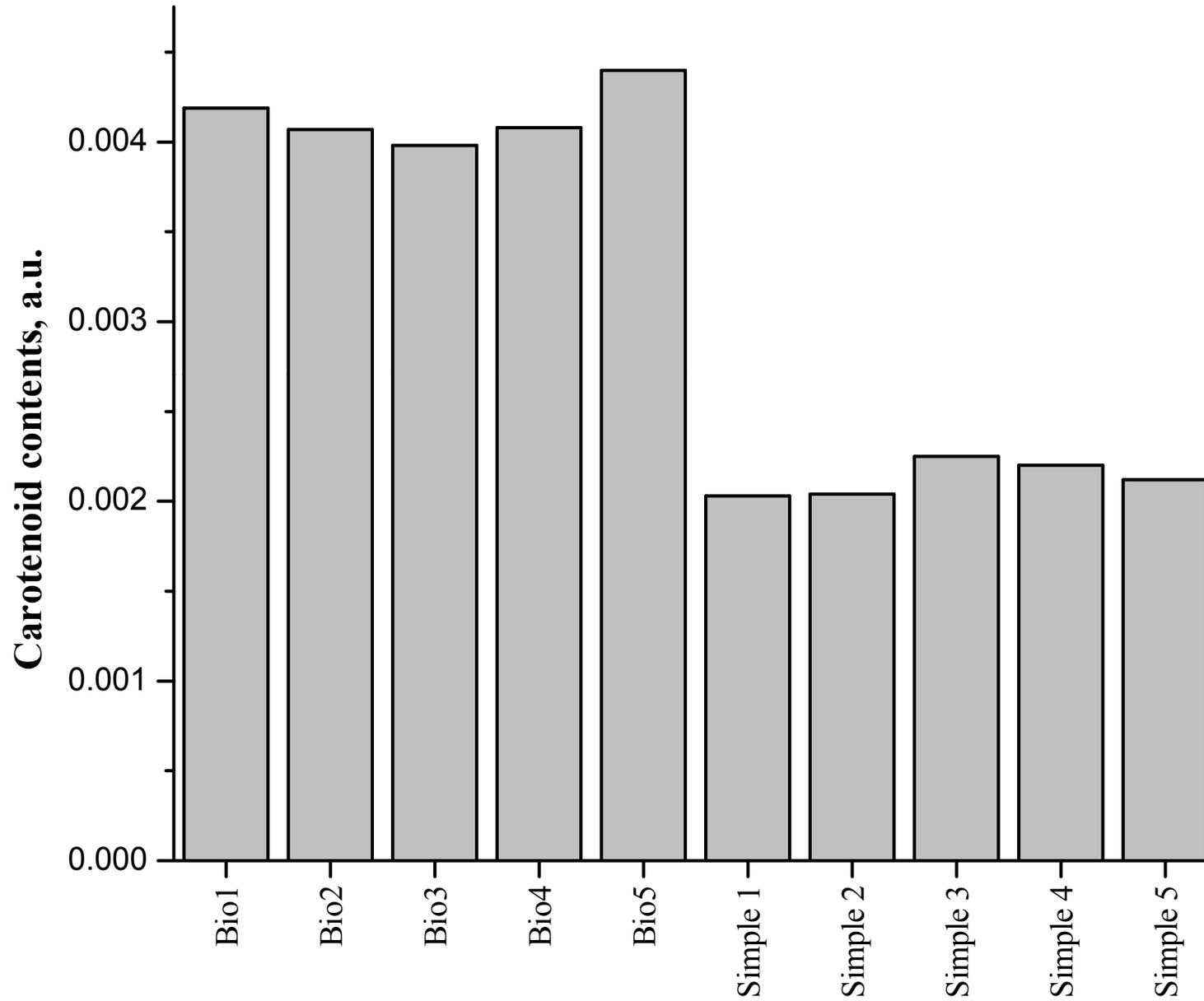


Можно ли обнаружить различия между натуральными и инкубаторскими яйцами?



Различия в содержании каротиноидов в желтке яйца

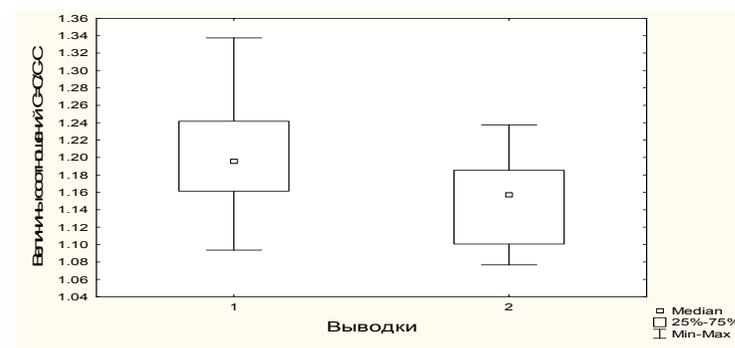
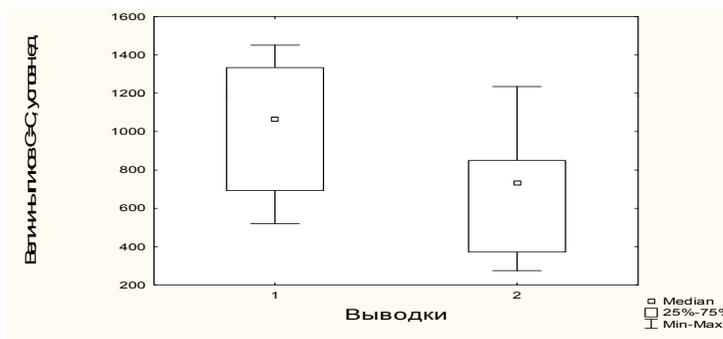
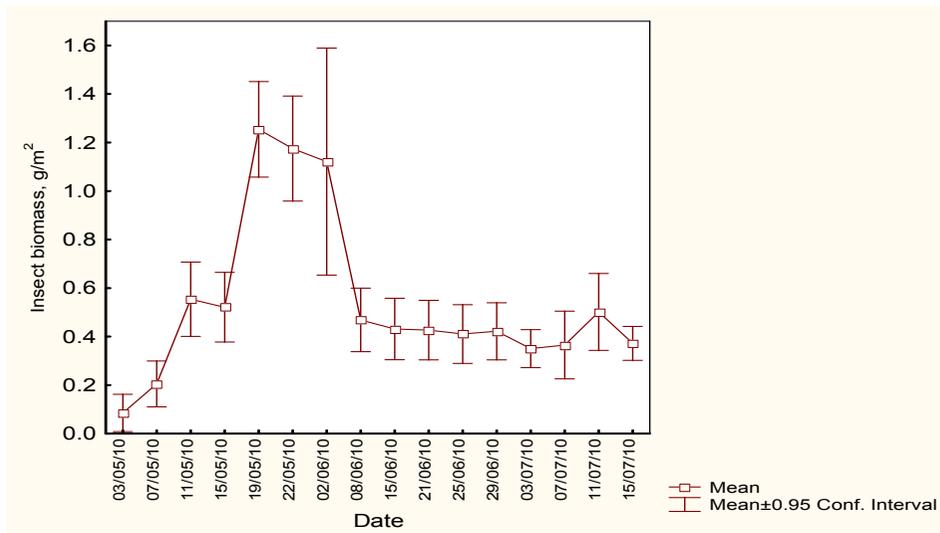
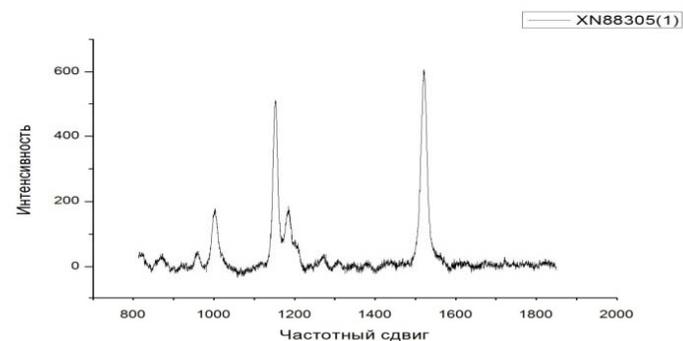
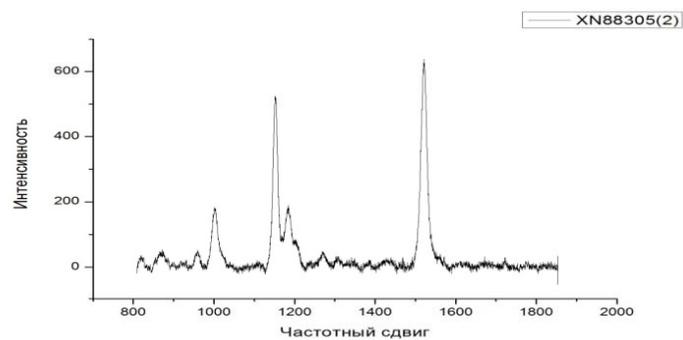
“bio” и “simple”



Объект исследования – Большая синица – *Parus major* L.



Различия в содержании и конформации каротиноидов в перьях синицы



Сезонные изменения биомассы и содержания каротина