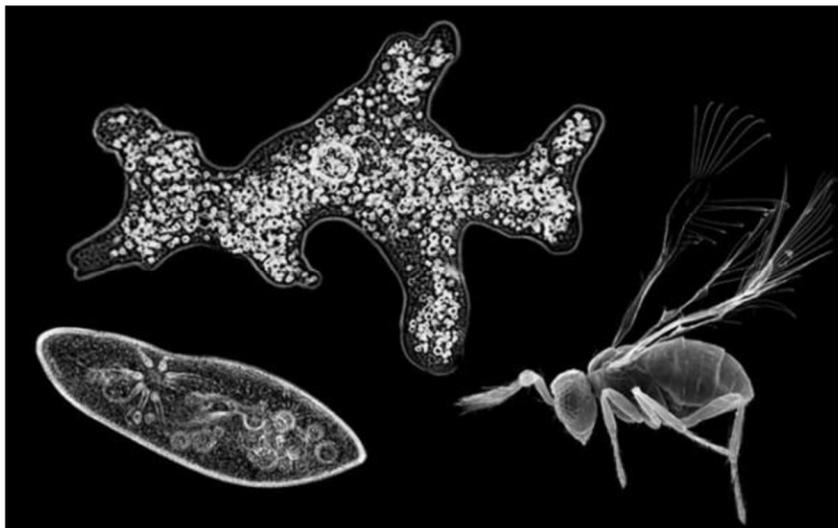


## Биология

### Задача 1. Как стать меньше?

Известно, что бактерии – самые маленькие и при этом самые многочисленные из всех известных на нашей планете живых организмов. Они встречаются повсеместно и обладают особенностями строения и функциями, которые позволяют им приспосабливаться к изменяющимся условиям и, фактически, господствовать на Земле. Но бактерии не одиноки в своих малых размерах. Есть и очень маленькие многоклеточные организмы, например, оса Мегафрагма мимаровая (*Megaphragma mymaripenne*), длина которой не более 0,2 мм.



Вопросы:

1. От чего зависит размер одноклеточных организмов? **(1 балл)**
2. За счет чего одноклеточные организмы достигают уменьшения размеров? **(1 балл)**
3. За счет чего возможно уменьшение размеров многоклеточных организмов? **(1 балл)**
4. Как Вы думаете, с чем связана миниатюризация ос Мегафрагм и чем это может быть им выгодно? **(1 балл)**
5. Представьте, что Вы открыли новое уникальное животное (например, насекомое), размер которого на несколько порядков меньше размеров других животных из этого же семейства. Перед Вам стоит задача понять, за счет чего же произошло такое поразительное уменьшение размеров. Какие ткани, органы и клетки Вы будете изучать в первую очередь? Какие бы Вы сделали предположения и как бы проверили свои догадки? **(3 балла)**

Решение:

1. Размер одноклеточных организмов определяется количеством и составом их внутриклеточных структур. Отсутствие ядра, митохондрий и центриолей у бактерий – один из способов уменьшить размер клетки. Чем больше в клетке хранится запасенных питательных веществ (на случай неблагоприятных условий), тем будет больше и размер. Бактерии питательные вещества практически не запасают, поскольку при плохих условиях они образуют споры и в таком виде переживают “до лучших времен”. Толщина и количество внешних стенок, наличие внутриклеточного цитоскелета и сложноустроенных жгутиков и

ворсинок также влияют на размер клетки (в сторону увеличения). Ядерные одноклеточные животные достигают уменьшения своих размеров за счет уменьшения размеров ядра (уменьшая количество ДНК, а значит, и количество кодируемых белков, упрощая свою организацию), а также за счет уменьшения количества и размеров других мембранных внутриклеточных органоидов.

2. Правильный ответ следует из первого подвопроса. Одноклеточные организмы достигают уменьшения своих размеров, в первую очередь, за счет уменьшения числа внутриклеточных структур и упрощения их устройства. Во вторую очередь, одноклеточные организмы уменьшают количество запасенных питательных веществ; в третью очередь, могут упрощаться и, как следствие уменьшатся в размерах мембранные структуры.

3. Размер многоклеточных организмов зависит от общего числа клеток и от их размеров. Таким образом, уменьшение размера может происходить как за счет снижения размеров клеток, так и за счет уменьшения числа клеток в составе органов и тканей.

4. Эти осы пошли по пути одновременного упрощения строения органов за счет уменьшения числа клеток (в данном случае, нервная система содержит рекордно малое количество нейронов) и уменьшения клеточных размеров за счет упрощения устройства клеток. Так, 95% нейронов этих животных не содержат ядра, “теряя” их на стадии перехода из личинки в имаго. Осы Мегафрагмы живут всего несколько дней, поэтому их нейроны используют тот запас белков, которые образовались на стадии личинки.

5. Принимаются любые обоснованные логичные ответы. Например, можно предложить такой путь: изучение под микроскопом (оптическим, электронным) морфологию животного и его отдельных частей и сравнить ее с морфологией тех животных, которые кажутся близкими филогенетически. Упрощение устройства органов может быть за счет снижения числа клеток и/или уменьшения числа компонентов клеток. Далее можно провести детальный анализ морфологии клеток из разных тканей при помощи специфического окрашивания органоидов и клеточных структур: ядра, митохондрий, центриолей, цитоскелета и проч. Таким образом можно выявить, не произошла ли “утрата” какой-либо из структур, что способствовало уменьшению размера клеток.

## **Задача 2. Что эффективнее?**

В одном научно-исследовательском институте три конкурирующие лаборатории занимались разработкой противоракового лекарственного препарата, особенностью которого было избирательное проникновение в раковые клетки. Первая группа разработала соединение, накапливающееся в цитоплазме опухолевых клеток, вторая – соединение, проникающее в митохондрии, третья – вещество, селективно транспортируемое в ядро. В основе действия всех соединений лежал один и тот же принцип: при освещении лазерным светом соединение участвовало в образовании радикала  $O_2^-$ , который, в свою очередь, инициировал окисление близко расположенных молекул.

### **Вопросы:**

1. Какие участки в соединениях всех трех типов были сходными, а какие различными **(0,5 балла)**? В общих чертах опишите строение каждого соединения и укажите, для чего нужна была каждая часть **(0,5 балла)**.

2. Как называются вещества, образующие супероксид-анион радикал при действии света **(0,5 балла)**? Какая длина волны лазерного света предпочтительнее при использовании таких веществ в тканях и органах и почему **(0,5 балла)**?
3. Расположите все три вещества по мере возрастания терапевтического эффекта. Ответ обоснуйте **(1 балл)**.
4. Какие еще активные формы кислорода (АФК) Вы знаете **(0,5 балла)**? Какие из АФК наиболее реакционноспособные и опасные для клеток **(0,5 балла)**?
5. Предложите еще какой-нибудь способ для направленного подавления именно раковых клеток **(2 балла)**.

**Решение:**

1. Сходным являются следующие участки: носитель молекулы-фотосенсибилизатора (продуцирующей АФК под действием лазерного света), участок, отвечающий за избирательное проникновение всей конструкции в раковые клетки и участок, обеспечивающий выход конструкции из эндосом в цитоплазму. Отличающиеся участки это: участок митохондриальной или ядерной локализации.
2. Это вещества-фотосенсибилизаторы. Предпочтительнее использовать красный лазер, поскольку красный свет глубже проникает в ткани и меньше сам по себе повреждает здоровые клетки.
3. Терапевтический эффект будет выше в случае конструкции, проникающей в ядро, поскольку супероксид-анион радикал будет повреждать ДНК. Повреждение и гибель всех митохондрий в клетке тоже будет способствовать гибели клетки, только вероятность того, что молекулы-транспортёры проникнут в подавляющее большинство митохондрий, очень мала. Кроме того, митохондрии обладают собственной системой защиты от супероксид-анион радикала, поскольку он образуется постоянно при работе дыхательной цепи.
4. АФК: перекись водорода, синглетный кислород, пероксинитрит ONOO<sup>-</sup>, гидроксил-анион радикал OH<sup>•</sup>. Самые агрессивные формы – это две последние из перечисленных.
5. Еще потенциально-действенный вариант – это направленная доставка в раковые клетки наноконструкций, которые будут, к примеру, нагреваться и нагревать окружающую клетку при действии лазера и тем самым нарушать их работу.

### ***Задача 3. Нанотехнологии и зрение***

В лаборатории университета Пенсильвании использовали приемы генной терапии, чтобы вылечить самцов беличьей обезьяны от врожденного дальтонизма (животные не различали зеленый и красные цвета). Проведенные проверочные эксперименты показали, что обезьяны приобрели правильное цветовое зрение. Любимым лакомством обезьянок были съедобные ягоды черной бузины, которые сотрудники собирали в соседнем лесу. Один из сотрудников забыл закрыть клетку обезьян и ночью они сбежали в лес, где наелись своих любимых ягод. Утром, когда обезьяны вернулись, оказалось, что у них всех пищевое отравление, вызванное тем, что они съели ядовитые ягоды бузины красной.

- 1) Стажер лаборатории расстроился, что операция не удалась. Но дальнейшие тесты выяснили, что обезьяны прошли тесты на цветовое зрение. А вы как думаете, в чем причина,

того что обезьяны перепутали красный и черный цвет ягод? Свой ответ объясните. (3 балла)

2) В каком современном нанобиотехнологическом методе используются молекулы-“родственники” зрительных пигментов, чтобы исследовать работу нервных клеток? (1 балл)

3) Какие фоторецепторы определяют цветное зрение у приматов, опишите их? К появлению фоторецепторов какого типа привела генная терапия? (4 балла)

4) Как вы думаете, какие витамины нужно принимать, чтобы улучшить зрение и почему?(1 балл) Почему и как именно отличается размер зрачка в темноте и на свету?(1 балл)

#### **Решение:**

1. Так как в темноте колбочки не работают, то за зрение в сумерках у приматов отвечают палочки. В темноте зрение человека становится черно-белым и наблюдается так называемый сдвиг Пуркинье. Красный цвет с темноте становится практически черным, а синие объекты более светлыми. Вероятно поэтому обезьяны и перепутали ягоды.

2. Это оптогенетика, которая основана на том, что методом генной инженерии в мембраны нервных клеток внедряют опсины, которые возбуждаются светом.

3. Известно, что цветное зрение, это вид зрительного ощущения, которое мы получаем при восприятии нашими глазами светового излучения, испускаемого источниками излучения или отраженного предметами. В глазе приматов существуют 2 типа фоторецепторов: колбочки и палочки. Палочки содержат зрительный пигмент родопсин, чувствительный в сине-зеленой части спектра. Колбочки содержат пигмент йодопсин. У приматов обнаружены три вида колбочек, колбочки S-типа, M-, и L-типа. Они чувствительны соответственно в фиолетово-синей (S от англ. Short — коротковолновый спектр), в зелено-желтой (M от англ. Medium — средневолновый) и в желто-красной (L от англ. Long — длинноволновый) частях спектра. У дальтоников не различающих красные и зеленые цвета – отсутствуют колбочки L- типа.

4. Для улучшения зрения медики советуют принимать витамины группы А, так как они участвуют в синтезе и родопсина, и йодопсина, которые представляют из себя опсин и окисленный витамин А (ретинол). Размер зрачка в темноте увеличивается, а на свету уменьшается, так как зрачок служит диафрагмой и через него регулируется световой поток, попадающий на сетчатку.

#### **Задача 4. «Кровавые» эксперименты Хагрида**

Во время одного из уроков в Хогвартсе Хагрид принес эритроцитарную массу, выделенную из крови магических существ. Это были эритроциты, выделенные из крови саламандры (маленькое огненное земноводное), раморы (серебристая рыба из Индийского океана), дракона (большой летающий ящер), феникса (сказочная птица), гиппогрифа (полулошадь-полуорел) и ре-эма (гигантский бык с золотистой кожей).

1. Учитывая происхождение перечисленных животных, ученики должны были разместить их в ряд, исходя из размера эритроцитов (от большего размера к меньшему). Выполните это же задание, аргументировав свое мнение (3 балла).

2. Следующим заданием было выделить из эритроцитов ДНК. Как вы думаете, в эритроцитах каких существ ДНК точно не было, у каких оно вероятно было, а у каких оно могло как быть, так и не быть. Поясните ход своих мыслей **(3 балла)**.

3. Ученики должны были изучить современный метод из мира маглов, основанный на нанотехнологиях, который позволил бы им исследовать свойства мембранносвязанного гемоглобина в интактных эритроцитах. Что за метод из нашего мира изучали ученики волшебной школы **(2 балла)**? Как Вы думаете, каким образом была получена эритроцитарная масса, если учесть, что у Хагрида не было центрифуги? **(2 балла)**

#### **Решение:**

1. В процессе эволюции позвоночных шла тенденция к уменьшению размера эритроцитов. У земноводных эритроциты больше чем у ящериц, у ящериц больше чем у птиц, у млекопитающих самые маленькие. Однако у рыб они по размеру сравнимы часто с эритроцитами птиц. Исходя из происхождения родственников этих существ из мира маглов, можно предположить, что самые большие эритроциты у саламандры (как у земноводного), затем у дракона, эритроциты у птицы феникс и у рыбы раморы могут быть похожего размера, немного меньше у полугрифа-полулошади – гиппогрифа и самые маленькие у ре-эма.

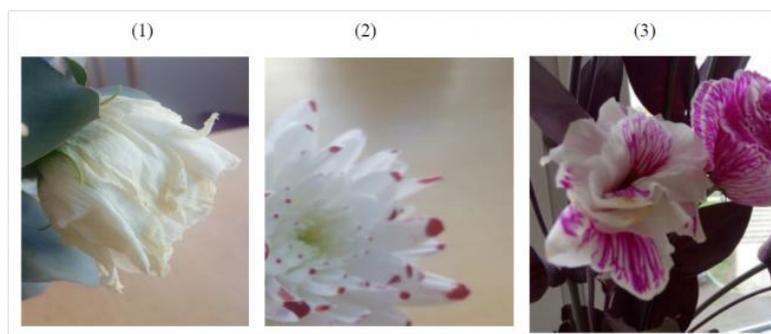
2. У большинства позвоночных, кроме млекопитающих, есть ядро и следовательно ДНК. Таким образом только в эритроцитах у ре-эма точно нет ДНК и непонятно, есть ли она в эритроцитах гиппогрифа. У остальных существ в эритроцитах ДНК скорее всего есть, за исключением саламандры. У некоторых видов саламандр эритроциты не содержат ядра.

3. Для исследования примембранного гемоглобина в интактных эритроцитах используется метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). За счет эффекта плазмонного резонанса, которым обладают наночастицы благородных металлов, метод ГКР позволяет изучать конформационные изменения в молекулах примембранного гемоглобина. Для того чтобы осадить эритроциты – без центрифуги, нужно просто подождать. Под силой тяжести эритроциты осядут и кровь разделится на две основные фракции – плазму и эритроцитарную массу.

#### **Задача 5. Как вырастить красивые цветы?**

Учитель биологии рассказал своему классу про методы генетики и направленного отбора растений с желаемыми особенностями, после чего дал классу первое сложное задание: за весну и лето вырастить самые красивые цветы, желательно с необычной окраской. При этом надо было использовать доступные приемы селекции и, конечно, здравый смысл. Саша, Света и Максим решили обязательно победить, но, как это часто бывает, со всеми летними делами совсем забыли о своем задании, вспомнив о нем всего лишь за несколько дней до начала учебного года. Сходив в ближайший цветочный магазин, каждый из них выбрал по букету цветов. Но как же сделать цветы необычной окраски? Не долго думая, Саша добавил в воду к своим цветам яркую краску, Света обрызгала свои цветы акварелью из пульверизатора, а Максим долил в воду к своему букету красивый концентрированный малиновый коллоидный раствор наночастиц золота, который нашел у своего старшего брата-химика среди реактивов, принесенных с работы. На следующий день ребята отправились в школу, где перед началом занятий устроили общую выставку-конкурс цветов.

Вот фотографии цветов, которые принесли наши герои (фотографии показаны в случайном порядке, не отражая порядок перечисления школьников в тексте):



Ребята были несколько удивлены, когда учитель биологии сказал, что они дисквалифицированы, а их цветы сняты с соревнований. В случае цветов с фотографии (1) такое решение было полностью понятно, так как цветы завяли. Для цветов с фотографий (2) и (3) учитель подробно объяснил, что ребята сделали с цветами и почему это не входит в перечень допустимых действий.

#### **Вопросы:**

1. Укажите, на какой фотографии показаны чьи цветы, что именно с ними сделали, почему цветы завяли/изменили окраску и как Вы и учитель об этом догадались **(1,5 балла)**.
2. Какие методы селекции могли бы использовать ребята, чтобы корректно выполнить свое задание **(2 балла)**? Какие цветы для этого они должны были бы выбрать **(0,5 балла)**?
3. А для чего вообще нужны цветы и их окраска **(1 балл)**?
4. От чего зависит окраска цветов **(1 балла)**?
5. При помощи каких приемов нанобиотехнологии можно вывести сорта цветов с необычной окраской **(2 балла)**? Будет ли это передаваться по наследству **(1 балл)**?
6. Предложите способ изменения окраски цветка у растения (приведите любой вариант), чтобы повысить его опыляемость **(1 балл)**.

#### **Решение:**

1. На фотографии (1) показан цветок из букета Максима, добавившего к цветам коллоидных раствор золота. Можно предположить, что наночастицы “забили” проводящую систему стеблей и вода поступала к цветкам в недостаточном количестве или не поступала вовсе. На фотографии (2) показан цветок из букета Светы, которая обрызгала краской цветы. Об этом свидетельствует четкая форма цветочных патен на лепестках и их локализация на кончиках цветов, куда в первую очередь и попадает краска. На фотографии (3) показаны цветы из букета Саши, который долил краситель в вазу с цветами. Данный сорт цветов (лизиантус) активно всасывает воду, а в данном случае – воду с красителем. Поэтому ярко-малиновый цвет распространился по жилкам цветков, в которых проходят проводящие воду сосуды. По такому характерному “полосатому” окрасу можно сразу определить подкрашивание цветов путем внесения краски в воду.

2. Предполагалось, что ученики за весну-лето должны посадить какие-то цветковые растения, быстро растущие, цветущие и дающие семена. При появлении первых цветов

провести перекрестное опыление между цветами с наиболее интересной окраской (если есть такая возможность), а потом из первого поколения отобрать семена от наиболее красивых цветов и снова их высадить. В таком случае, конечно, не предполагается выведение каких-то удивительных новых сортовых цветов, так как на это требуется много времени. Для того, чтобы успеть выполнить задание за лето, ребята должны были влять растения с коротким вегетативным периодом. Возможные варианты: петуния (можно высадить в виде готового кустика в апреле-мае или растить из семян дома; растение быстро дает цветы и можно успеть за лето высадить еще новые растения из полученных семян), мирабилис ялапа (он же – ночная красавица или зорька).

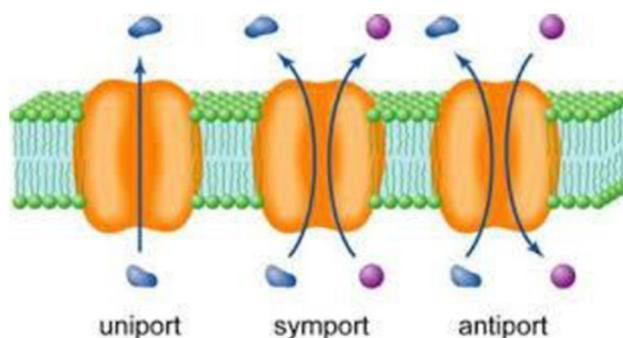
3. Цветы нужны, в первую очередь, чтобы привлекать насекомых-опылителей. В зависимости от опылителя (зрения, формы тела и крыльев, и т.п.) у цветов в ходе эволюции сформировались цветки разной формы, цвета и с самым разным запахом.

4. Окраска цветов зависит от пигментного состава лепестков. Разные пигменты поглощают свет разных длин волн, что и делает окраску цветов самой разной. При чередовании, сочетании пигментов возникают узоры и причудливые оттенки лепестков.

5. Один из подходов – это трансфекция с последующей экспрессией в клетках лепестков новых генов, отвечающих за синтез пигментов, нехарактерных для данного растения. Чтобы новая окраска передавалась по наследству, необходимо, чтобы внесенный ген встроился в собственную молекулу ДНК в ядре клеток.

6. Надо рассмотреть особенность насекомых-опылителей. Возможный вариант – это экспрессия генов, отвечающих за ферменты, синтезирующие пигменты, которые насекомые-опылители видят лучше всего. Другой вариант – экспрессировать синтез ферментов, синтезирующих пигменты, которые видят другие, нехарактерные для данных цветов насекомые-опылители и тем самым увеличить количество видов насекомых, участвующих в опылении.

### **Задача 6. Мембранный транспорт**



У любой живой клетки концентрация многих веществ внутри клетки отличается от их концентрации снаружи. Например, для нормального функционирования клеток они должны уметь создавать внутри клетки повышенную по сравнению с окружающей средой концентрацию глюкозы и других важных метаболитов. Транспорт многих таких веществ обеспечивается специализированными белками – обменниками и котранспортерами, которые используют градиенты одних веществ для транспорта других веществ. Клеткам бывает нужно и избавляться от вредных для них веществ, например маленький (110 аминокислот) белок бактерий EmgE обеспечивает резистентность к различным

лекарственным веществам, позволяя двум протонам  $H^+$  входить в клетку в обмен на вывод одной молекулы положительно заряженного лекарственного вещества.

### Вопросы:

1. Приведите примеры ионов и молекул, для которых концентрация внутри клетки отличается от концентрации экстраклеточной среды. Как клетка создает такие градиенты? **(По 0.5 балла за каждый пример, в сумме не более 3 баллов)**
2. Почему для вывода лекарственных веществ из бактерии, белок EmrE должен обменивать молекулу лекарства на несколько протонов? **(1 балл)**
3. В клетках апикального эпителия тонкого кишечника один из белков-котранспортеров (NaPi IIc) использует градиент ионов  $Na^+$  для всасывания ионов фосфата ( $HPO_4^{2-}$ ) из просвета кишечника перенося два иона  $Na^+$  вместе с одним ионом  $HPO_4^{2-}$ . Влияет ли такой транспорт ионов на мембранный потенциал клетки (разность электрических потенциалов между внутренним содержимым клетки и наружной средой)? Принимая, что соотношение концентраций  $[Na^+]$  снаружи и внутри постоянно и составляет 10:1, рассчитайте теоретическое равновесное соотношение концентраций внутри и снаружи клетки для  $HPO_4^{2-}$  **(3 балла)**
4. В клетках эпителия кишечника содержатся также системы котранспорта, переносящие внутрь клетки с одной молекулой глюкозы один ион  $Na^+$  либо два иона  $Na^+$ . Влияет ли такой транспорт на мембранный потенциал клетки? Принимая, что снаружи клетки  $[Na^+]$  в 10 раз больше, чем внутри, и мембранный потенциал клетки  $-70$  мВ, во сколько раз концентрация глюкозы в клетке превысит концентрацию глюкозы в просвете кишечника, если транспорт глюкозы опосредуется первым типом белка-котранспортера? Вторым белком-транспортером? **(5 баллов)**
5. В эпителии какого еще органа необходимо иметь множество белков-обменников и котранспортеров для глюкозы, аминокислот и других важных метаболитов? **(1 балл)**
6. Вы хотите сконструировать наноразмерную машину, которая будет удалять из клетки вредные вещества. За счет чего вы можете сдвинуть равновесие реакции в сторону удаления веществ из клетки? Можно ли достичь результата, используя различное средство такого переносчика к молекулам-мишеням по разные стороны от мембраны? **(2 балла)**

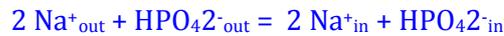
### Решение:

- а) Ионы:  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ , аминокислоты, нуклеотиды, сахара, белки. Базовые градиенты  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , в конечном итоге задаются при помощи активного транспорта белками-насосами, затрачивающими энергию гидролиза АТФ для термодинамически невыгодного распределения данных ионов. Градиенты по  $Na^+$  и  $H^+$  часто используются клеткой для т.н. вторичного активного транспорта, сопрягая термодинамически выгодный поток  $Na^+$  или  $H^+$  через мембрану клетки с термодинамически невыгодным потоком сахаров или аминокислот.
- б) Требуется сопряжение энергетически выгодного процесса с энергетически невыгодным. Перенос нескольких протонов на одну молекулу лекарства задает "коэффициент усиления", позволяющий вывести больше молекул лекарства из клетки.
- в) Такой транспорт не связан с суммарным переносом заряда через мембраны клеток.

Другие котранспортеры этого же семейства переносят 3 иона  $\text{Na}^+$  на один фосфат, создавая электрический ток через клетку.

“Школьное” решение:

у нас фактически есть реакция:



Соотношение констант скоростей прямой и обратной реакций имеет вид:

$$K_p = \frac{[\text{Na}^+_{\text{out}}]^2 [\text{HPO}_4^{2-}_{\text{out}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]^2 [\text{HPO}_4^{2-}_{\text{in}}]}$$

В состоянии равновесия  $K_p=1$ , и  $\frac{[\text{HPO}_4^{2-}_{\text{in}}]}{[\text{HPO}_4^{2-}_{\text{out}}]} = \left(\frac{[\text{Na}^+_{\text{out}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]}\right)^2 = 100$

“Полное” решение:

Условие равновесия:

$$2\Delta\mu_{\text{Na}^+} = -\Delta\mu_{\text{HPO}_4^{2-}}, \text{ отсюда}$$

+++++

- d) В обоих случаях наблюдается суммарный электрический ток через мембрану. Условие равновесия в терминах электрохимических потенциалов:

$$n\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}^+} = -\Delta\bar{\mu}_G, \text{ где } G - \text{ глюкоза, } n - \text{ стехиометрия по } \text{Na}^+, 2 \text{ или } 3; \text{ отсюда}$$

$$nRT \ln \frac{[\text{Na}^+_{\text{out}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]} - nF\Delta\varphi = RT \ln \frac{[G_{\text{in}}]}{[G_{\text{out}}]} \Rightarrow$$

$$\ln \left(\frac{[\text{Na}^+_{\text{out}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]}\right)^n - n \frac{F\Delta\varphi}{RT} = \ln \frac{[G_{\text{in}}]}{[G_{\text{out}}]} \Rightarrow$$

$$\frac{[G_{\text{in}}]}{[G_{\text{out}}]} = \left(\frac{[\text{Na}^+_{\text{out}}]}{[\text{Na}^+_{\text{in}}]}\right)^n \cdot e^{-\frac{nF\Delta\varphi}{RT}} \Rightarrow \text{ при } n=1, \frac{[G_{\text{in}}]}{[G_{\text{out}}]} \approx 150 \quad ; \text{ при } n=2, \frac{[G_{\text{in}}]}{[G_{\text{out}}]} \approx 22500$$

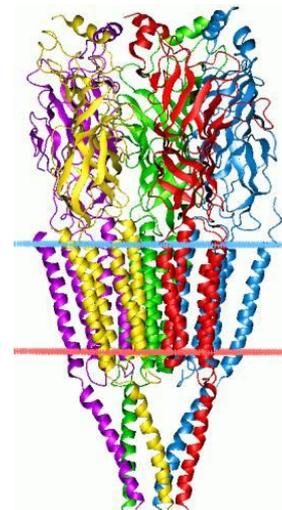
(T=300K)

- e) Прежде всего, почечные каналцы, где из первичного фильтрата нужно забрать обратно все потенциально полезное, прежде чем выводить из организма.
- f) **Существующие градиенты ионов, работая по принципу котранспорта или обменника, можно напрямую задействовать электрический трансмембранный потенциал. Можно также сразу же удалять вещество из внеклеточного пространства, оставив сам процесс транспорта пассивным. Удалять из реакционного объема можно переводя в связанное состояние,**

*разрушая вещество и т.д. Нет, только разного средства недостаточно, поскольку это все равно будет термодинамически пассивный процесс, и с его помощью невозможно создать неравновесное распределение вещества.*

### **Задача 7. Каналы-рецепторы**

Нейроны нервной системы несут на себе различные виды рецепторов. Активация некоторых из них приводит к гиперполяризации мембраны нейрона (увеличению разности электрических потенциалов между внутренним содержимым клетки и наружной средой) и, следовательно, торможению активности, тогда как активация других рецепторов приводит к деполяризации мембраны, активируя нейрон. Так, рецепторы nAChR к ацетилхолину (чувствительные к никотину) при активации ацетилхолином переходят в проводящее состояние и проводят катионы внутрь клетки, вызывая деполяризацию. Родственные им и гомологичные по структуре рецепторы к гамма-аминомасляной кислоте (GABAR) пропускают ионы хлора и вызывают гиперполяризацию нейрона.



#### **Вопросы:**

1. Приведите примеры ионных каналов, присутствующих в мембране нейронов, и опишите способ их активации и влияние на мембранный потенциал нейрона. **(по 1 баллу за каждый полный пример, но не более 3 баллов в сумме)**
2. Чем обеспечивается селективность (избирательность) проницаемости ионных каналов для разных ионов? **(2 балла)**
3. Можно ли (и как) заставить nAChR проводить анионы вместо катионов, а GABAR – катионы вместо анионов **(2 балла)**? Как изменится в этом случае их действие на активность нейрона? **(2 балла)**

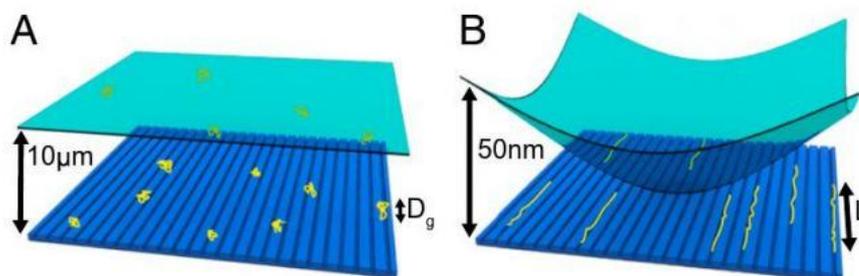
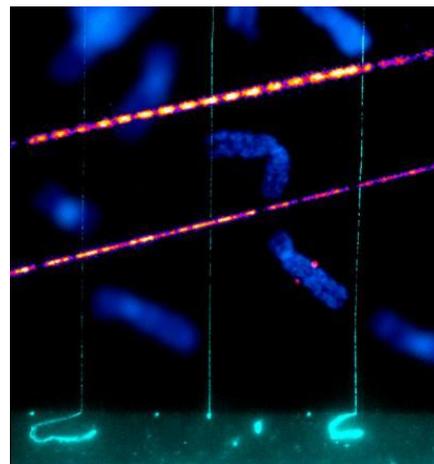
#### **Решение:**

1. Потенциал-зависимые: Na-каналы (чувствительны к деполяризации, приводят к деполяризации), K-каналы (чувствительны к деполяризации, приводят к гиперполяризации), Ca-каналы (чувствительны к деполяризации, приводят к деполяризации). Лиганд-оперируемые: AMPA-рецепторы (активируются глутаматом, приводят к деполяризации), NMDA-рецепторы (активируются глутаматом и глицином либо D-серинном + деполяризацией, приводят к деполяризации) + многие другие
2. Селективность обеспечивается остатками аминокислот, экспонированными внутрь поры канала в области т.н. селективного фильтра + диаметром поры канала в этой области. Положительно заряженные остатки в селективном фильтре соответствуют анионным каналам, отрицательно заряженные – катионным каналам (т.е. проницаемым для катионов).
3. При помощи сайт-направленного мутагенеза можно заместить аминокислоты селективного фильтра канала на аминокислоты с противоположно заряженными остатками. Действие на активность должно также измениться на противоположное, с некоторыми оговорками: если канал, ставший катионным, окажется селективным

для ионов  $K^+$ , то он продолжит оказывать гиперполяризующее действие на мембрану нейрона.

### **Задача 8. Укладываем ДНК в наноканавки**

Для исследования генома бывает важно растянуть довольно длинные, окрашенные флуоресцентным красителем отрезки ДНК до почти линейного состояния для последующего визуального исследования под микроскопом. Обычно это довольно сложная задача, потому что молекулы ДНК в растворе приобретают форму клубка и вовсе не хотят растягиваться в узких наноразмерных канальцах! Группа ученых из университета МакГилл (Канада) в 2014 г. опубликовала статью [[doi:10.1073/pnas.1321089111](https://doi.org/10.1073/pnas.1321089111)], в которой описала простой метод растягивания молекул ДНК до почти линейного состояния в узких (27 нм) канавках. Этот метод заключается в следующем: молекулы ДНК помещают в экспериментальную камеру, дно которой покрыто узкими наноканавками. Камера содержит раствор и накрыта покровным стеклом, опирающимся на стенки высотой  $\sim 10$  мкм. В исходном состоянии все молекулы ДНК представляют собой “клубочки”. Затем на поверхностное стекло начинает давить линза объектива микроскопа, прогибая его. Когда расстояние между стеклом и подложкой оказывается порядка десятков нанометров, почти все молекулы ДНК оказываются уложенными в канавки и растянутыми до 90% своей длины.



#### **Вопросы:**

1. Зачем может потребоваться исследовать молекулы ДНК в растянутом состоянии? **(2 балла)**
2. Почему (за счет каких сил) в растворе молекулы ДНК приобретают форму клубка? **(3 балла)**
3. Почему (за счет каких сил) молекулы ДНК при использовании такой методики в конечном итоге оказываются в канавках? **(5 баллов)**
4. Как, используя флуоресцентный краситель, который встраивается между отдельными парами оснований, и меняя температуру рабочего раствора, картировать генетический код молекулы ДНК **(2 балла)**? С каким разрешением это можно делать? **(2 балла)**

#### **Решение:**

1. Для исследования генома и относительно грубого установления нуклеотидной последовательности (ДНК-"отпечатки пальцев"). Можно устанавливать наличие крупномасштабных мутаций, ассоциированных с различными патологиями, таких как делеции значительных участков ДНК, многочисленные повторы и т.д.
2. Для линейных молекул полимеров в растворе термодинамически выгодна конформация в виде т.н. статистического клубка. Основную роль здесь играет энтропийная составляющая, потому что такой клубок может быть составлен большим количеством возможных отдельных конфигураций, т.е. характеризуется большой энтропией
3. При ограничении объема в камере возникает ситуация, когда молекула ДНК внутри канавки имеет больше пространства для различных конформационных конфигураций, чем между стеклом и дном камеры. Так что процесс "заползания" молекул ДНК в канавки также определяется энтропией.
4. Меняя температуру можно добиться плавления (т.е. расхождения цепей) ДНК в области, богатой А-Т парами нуклеотидов при сохранении нативной структуры в областях, богатых Г-Ц парами нуклеотидов, поскольку последние образованы тремя водородными связями, а А-Т пары - двумя. В местах плавления ДНК интеркалирующий краситель будет вымываться в раствор. Таким образом, возникнет "полосатый" паттерн окрашивания молекулы ДНК, что позволяет получать "портрет" нуклеотидной последовательности данной молекулы ДНК. Поскольку молекула исследуется под световым микроскопом, разрешение составляет около 200 нм, т.е. при 0.33 нм на 1 нуклеотид, около 600 пар нуклеотидов.

### ***Задача 9. Зелёные и не совсем зелёные флуоресцентные белки***

В 2008 году Нобелевская Премия по химии присуждена трём учёным: Осаму Шимамуре, Роджеру Тсину и Мартину Шалфи «за открытие и изучение зеленого флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* (green fluorescent protein, GFP)». Этот белок (рис.1) нашел широчайшее применение в биологии. Впоследствии были открыты и химически синтезированы его разноцветные аналоги: от сине-фиолетового до красного и даже инфракрасного (рис.2).



Рис. 1. Памятник зеленому флуоресцентному белку в США

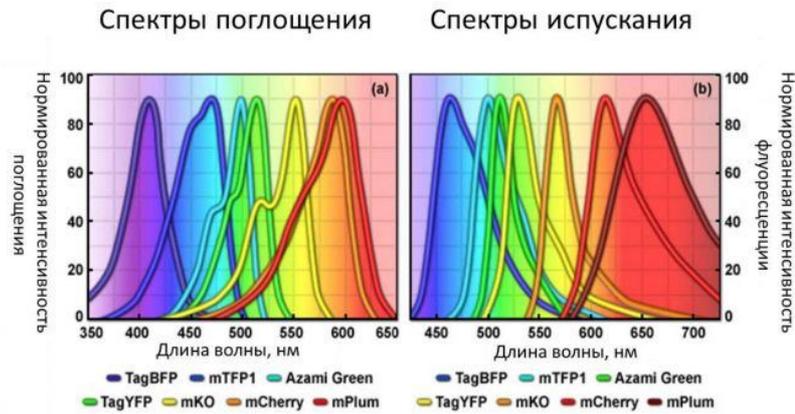


Рис.2. Спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (b) 7 флуоресцентных белков.

### Вопросы:

1. У каких живых организмов (кроме медуз) имеются GFP-подобные белки (не менее 3)?(1 балл)
2. Какова может быть биологическая роль GFP? (1 балл)
3. Какой из GFP-подобных белков, на Ваш взгляд, наиболее перспективен для применения в медицинской диагностике? Почему? (0,5 балла)
4. Почему GFP обладает флуоресценцией? (1 вариант ответа) (0,5 балла) а. GFP содержит в себе ионы металла б. GFP содержит в себе хлорофилл с. GFP содержит в себе молибдоптерин d. GFP содержит в себе хромофорную группу, образованную из аминокислот самого белка
5. Чем обусловлены спектральные различия GFP-подобных белков? (несколько вариантов ответа) (1 балл) а. нарушением встраивания хромофора в белок б. аминокислотным составом с. различиями в конформации хромофора d. отсутствием молекулярного кислорода на первом этапе синтеза хромофора е. взаимодействием с другими белками f. фолдингом
6. Какие из предложенных веществ обладают флуоресценцией? (несколько вариантов ответа) (1 балл) а. квантовые точки б. родамин с. фосфатидилхолин d. гепарин е. триптофан f. ДНК
7. Представьте, что Вы заведуете прекрасно оснащенной лабораторией, в которой имеется флуоресцентный конфокальный микроскоп. К Вам пришел молодой амбициозный студент Петя, для которого Вам необходимо придумать тему дипломной работы.
  - а) Подберите для Пети не менее трёх пар любых молекул в клетке, взаимодействие или колокализацию которых можно изучать с помощью семейства GFP белков методом флуоресцентной конфокальной микроскопии. (3 балла)
  - б) Поясните Пете, какие молекулы можно изучать с помощью GFP, а какие – нет. Свой ответ обоснуйте. Как увидеть молекулы, которые нельзя пометить GFP? (1 балл)
  - с) Поздравляю! Ваш студент защитил диплом на отлично. Вы настолько заинтересовали Петю наукой, что он решил продолжать свое исследование. Однако разрешение

конфокального микроскопа кажется ему недостаточным. Какие существуют методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (как минимум два)? (1 балл)

**Решение:**

1. У многих видов моллюсков, нематод, ракообразных, губок, иглокожих и т.д.
2. Хотя бы 1 из предложенных вариантов: вторичный эмиттер в биолюминесцентных системах; защита от солнца для симбиотических водорослей кораллов; окраска; трансфер электронов на различные молекулы-акцепторы; предположительно, защита от АФК
3. например, красный или инфракрасный флуоресцентный белок, так как более коротковолновое излучение хуже проникает в ткани организма.
4. d
5. b, c, f
6. a, b, e
7. а-с) Флуоресцентные белки, слитые в одной рамке считывания с интересующими белками, позволяют наблюдать за их локализацией. Это основное применение GFP.

В клетке белки осуществляют 4 основных типа взаимодействий:

белок-белковое

липид-белковое

НК-белковое (где НК - нуклеиновые кислоты)

взаимодействие с низкомолекулярными агентами (например,  $Ca^{2+}$  с кальмодулином, АТФ с АТФ-синтетазами и пр.)

Поэтому для белок-белкового взаимодействия можно предложить любые, даже хорошо изученные пары белков.

Для изучения локализации липидов можно использовать меченные GFP белки, встроенные в плазматическую мембрану. Для прямой визуализации липидов используют липофильные красители или сольватохромные (меняющие цвет при изменении полярности среды).

Нуклеиновые кислоты тоже могут быть помечены GFP лишь косвенно: с помощью РНК- или ДНК-связывающих белковых доменов. Если необходимо пометить именно ДНК в ядре, то чаще всего используют краситель DAPI (синяя флуоресценция при УФ-облучении).

Для некоторых низкомолекулярных агентов, например, для ионов кальция, есть специальные флуоресцентные зонды. Однако это скорее исключение.

Поэтому в данном случае засчитывается любой ответ, учитывающий вышеизложенные положения.

*Самые известные типы микроскопии сверхвысокого разрешения – PALM и STED, за разработку которых в 2014 году была присуждена Нобелевская премия по химии.*

## Задача 10. СОЭ

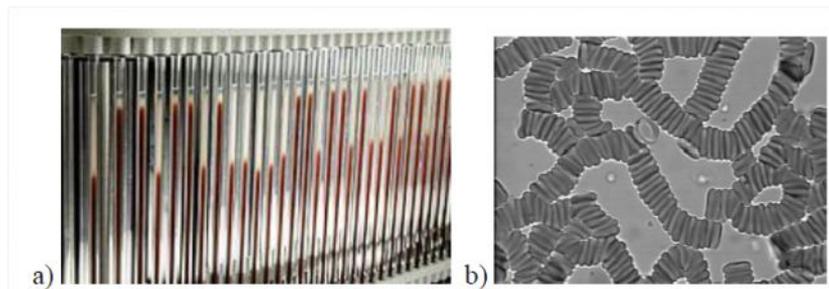


Рис.1.

Вам наверняка делали общий анализ крови, одним из важнейших клинических показателей которого является скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Этот простой тест уже почти 100 лет помогает выявлять неполадки в организме, позволяя в большинстве случаев отличить легкую простуду от более серьезных патологий.

1. Каким образом измеряют СОЭ? О чем говорит врачам его величина? **(1 балл)**

Кровь – типичная коллоидная система, главными компонентами которой являются эритроциты – основные переносчики кислорода в организме. Красные кровяные тельца человека имеют дисковидную форму и несущую отрицательный заряд поверхность.

2. Какие основные силы препятствуют слипанию (агрегации) эритроцитов в крови, циркулирующей по организму? **(1 балл)**

Между красными кровяными тельцами, тем не менее, присутствуют и заметные силы притяжения: рассматривая под микроскопом препарат крови, можно заметить, что эритроциты обратимо слипаются друг с другом.

3. Объясните, почему при агрегации эритроцитов преимущественно образуются именно столбики рис. 1b. **(0,5 балла)** Какое поведение эритроцитов при агрегации увидит биолог в микроскоп, если слить препараты крови человека (диаметр эритроцитов ~6,5 мкм) и кролика (диаметр эритроцитов ~8 мкм)? **(0,5 балла)**

4. Поясните, как степень агрегации эритроцитов влияет на СОЭ. **(1 балл)**

Существует две модели, описывающие возникновение агрегации эритроцитов в присутствии белков, полимеров и других наночастиц и приводящие к близким выводам (рис. 2).

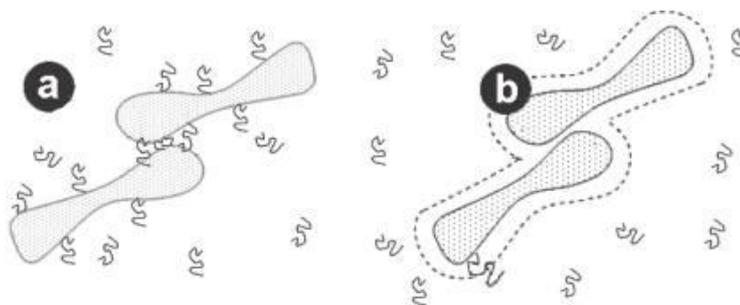


Рис. 2. а) Вспомогательные частицы адсорбируются двумя половинками на поверхностях соседних эритроцитов и таким образом удерживают их.

б) Возле поверхности эритроцитов образуется обедненный слой, поскольку частицы не могут занимать весь объем возле поверхности эритроцита; перекрывание обедненных слоев приводит к увеличению объема, доступного для наночастиц (то есть, суммарная энтропия системы увеличивается за счет увеличения энтропии наночастиц).

5. Почему при болезнях происходит изменение величины СОЭ? **(1 балл)** Какие белки плазмы крови сильнее всего влияют на такое изменение, и как это связано с их концентрациями и размерами? **(1 балл)** Предложите схему эксперимента (желательно с использованием наглядных нанотехнологий), который позволил бы установить, какой именно из двух рассмотренных моделей агрегации соответствуют эти белки. **(1 балл)**

Еще одним параметром, позволяющим оценить тяжесть заболевания, является концентрация С-реактивного белка, которая возрастает при воспалительных процессах.

6. Почему изменения концентрации С-реактивного белка мало сказываются на СОЭ? **(1 балл)** Почему оценка эффективности лечения по измерениям величины СОЭ, а не по измерению концентрации С-реактивного белка может приводить к неверным выводам (каким?)? **(1 балл)**

**Решение:**

**1. Каким образом измеряют СОЭ? Что говорит врачам его величина? (1 балл)**

Иллюстрацией-подсказкой к ответу служит первая картинка из условия. Во взятую кровь добавляют антикоагулянт (препятствует свертыванию, например, цитрат натрия) и помещают в стандартизированную пробирку или капилляр со шкалой. Кровь со временем разделяется на 2 слоя: в нижнем оседают эритроциты, в верхнем остается плазма (см. рис). Через 1 час по шкале измеряют высоту образовавшегося слоя плазмы в миллиметрах – она численно равна СОЭ.

Чаще всего отличие СОЭ от нормы дает повод заподозрить инфекцию или другие патологические процессы в организме. Обычно при болезнях СОЭ повышается: по тому, насколько сильно оно повышено, врач может примерно оценить интенсивность воспалительных процессов. Однако на СОЭ влияет множество разных факторов, поэтому возможны случаи, когда при болезни СОЭ не выше нормы или, наоборот, повышенное СОЭ может обуславливаться непатологическими состояниями.

**2. Какие основные силы препятствуют слипанию (агрегации) эритроцитов в крови, циркулирующей по организму? (1 балл)**

Сила кулоновского отталкивания одноименных зарядов и сила вязкого трения (в организме кровь постоянно перемешивается, вязкое трение при перемешивании способствует разделению агрегатов).

*Между красными кровяными тельцами, тем не менее, присутствуют и заметные силы притяжения: рассматривая под микроскопом препарат крови, можно заметить, что эритроциты обратимо слипаются друг с другом.*

**3. Объясните, почему при агрегации эритроцитов преимущественно образуются именно столбики рис. 1б. (0,5 балла)** Какое поведение эритроцитов при **агрегации** увидит биолог в микроскоп, если слить препараты крови человека (диаметр эритроцитов ~6,5 мкм) и кролика (диаметр эритроцитов ~8 мкм)? **(0,5 балла)**

Очевидно, при агрегации сила притяжения преобладает над отталкиванием. Сила притяжения между эритроцитами будет максимальна при максимальной площади контакта, поэтому, эритроцит будет сильнее удерживаться, если «прилипнет» в продолжение столбика, а не к его боковой поверхности.

При **агрегации** (не гемолизе и не агглютинации с участием антигенов) человеческие эритроциты будут преимущественно слипаться с человеческими, а кроличьи – с кроличьими. Лишь при таком способе агрегации суммарная площадь свободной поверхности будет минимальна. Если же представить цепочку из чередующихся маленьких и больших эритроцитов, то при таком расположении часть «внутренней» поверхности больших эритроцитов остается свободной.

К сожалению, многие участники решили (не думая) воспользоваться неправильными чужими ответами на эти 2 вопроса.

#### 4. Поясните, как степень агрегации эритроцитов влияет на СОЭ. (1 балл)

Масса столбика пропорциональна количеству эритроцитов в столбике, а сопротивление жидкости при осаждении столбика пропорционально площади сечения столбика (т.е., площади одного эритроцита). Поэтому столбики с большим числом эритроцитов (при большей степени агрегации) будут осаждаться быстрее – СОЭ возрастет.

Существует две модели, описывающие возникновение агрегации эритроцитов в присутствии белков, полимеров и других наночастиц и приводящие к близким выводам (рис. 2).

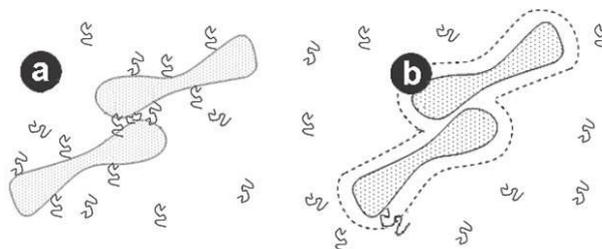


Рис. 2. а) Вспомогательные частицы адсорбируются двумя половинками на поверхностях соседних эритроцитов и таким образом удерживают их. б) Возле поверхности эритроцитов образуется обедненный слой, поскольку частицы не могут занимать весь объем возле поверхности эритроцита; перекрывание обедненных слоев приводит к увеличению объема, доступного для наночастиц (то есть, суммарная энтропия системы увеличивается за счет увеличения энтропии наночастиц).

#### 5. Почему при болезнях происходит изменение величины СОЭ? (1 балл) Какие белки плазмы крови сильнее всего влияют на такое изменение, и как это связано с их концентрациями и размерами? (1 балла)

Как мы уже знаем из ответа на первый вопрос, при болезнях обычно происходит увеличение СОЭ, которое (как следует из ответа на предыдущий пункт) можно связать с увеличением степени агрегации эритроцитов. Используя любую из предложенных моделей, мы приходим к выводу, что увеличение степени агрегации эритроцитов должно произойти при увеличении концентрации белков в плазме крови. Несложно найти в сети Интернет, что при заболеваниях в крови *возрастает* концентрация **белков острой фазы** (фибриноген, иммуноглобулины, С-реактивный белок и другие), которые помогают организму справляться с болезнью – именно они несут главную ответственность за повышение СОЭ при болезнях.

При одинаковом количестве белков, лучше всего «связывать» эритроциты (повышать СОЭ) должны, во-первых, большие белки (больше контакт с эритроцитом по первой модели, больше объем обедненного слоя по второй модели), во-вторых – ассиметричные белки («палочки», а не «шарики»). С другой стороны, сильнее всего будут повышать СОЭ те белки, чей вклад в увеличении концентрации белков острой фазы максимален. Поэтому наибольший эффект на увеличение СОЭ оказывает **фибриноген** (за ним идут глобулины, у которых меньше размер, менее ассиметричная форма, меньше вклад в суммарное изменение концентраций).

*Предложите схему эксперимента (желательно с использованием наглядных нанотехнологий), который позволил бы установить, какой именно из двух рассмотренных моделей агрегации соответствуют эти белки. (1 балла)*

Очевидное различие моделей заключается в наличии/отсутствии молекул белков между эритроцитами в стопках. Значит, необходимо как-то отследить, есть ли, например, фибриноген между эритроцитами в столбике. Для этого к его молекуле можно «пришить» маленькую светящуюся метку, например, квантовую точку (не перекрывающуюся по спектру с красным гемоглобином, дополнительно, при этом, убедившись, что помеченный белок изменяет СОЭ аналогично немодифицированному), и посмотреть «на просвет» стопку эритроцитов. Чтобы убедиться, что меченые белки между эритроцитов попали не случайно, можно провести контрольный опыт с «разъединенными» белком и квантовой точкой (при этом интенсивность свечения метки в стопке эритроцитов должна быть значительно ниже, если верна первая модель, и такая же, если вторая).

**6. Почему изменения концентрации С-реактивного белка мало сказываются на СОЭ? (1 балл)**  
*Почему оценка эффективности лечения по измерениям величины СОЭ, а не по измерению концентрации С-реактивного белка может приводить к неверным выводам (каким?)? (1 балл)*

Ответ на этот вопрос частично кроется в ответе на предыдущий. В отличие от фибриногена, С-реактивный белок меньше, более симметричен и, главное, в большинстве случаев его концентрация в крови гораздо меньше концентраций других белков. Поэтому его вклад в увеличение СОЭ сильно маскируется на фоне вклада других белков острой фазы.

Образовавшаяся в начале болезни повышенная концентрация фибриногена приходит к норме довольно медленно (большое время жизни фибриногена в крови). Поэтому повышенное СОЭ после курса лечения может ошибочно говорить о наличии воспалительных процессов (и неэффективности лечения). Время жизни в крови С-реактивного белка существенно меньше, поэтому он может точно показать, насколько уменьшается в ходе лечения воспалительный процесс – т.е. оценить эффективность выбранного метода лечения.

Также стоит отметить, что поскольку СОЭ зависит от множества факторов (например, от вязкости крови), в относительно редких случаях это также может приводить к неверным выводам.