

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 612.64

ГР НИОКР 01201351274

№ ИС ГЗ 0108-2014-0003



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ТЕМА 3. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО И КЛЕТОЧНОГО ГОМЕОСТАЗА
В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

(заключительный отчет)

Руководитель темы, д.б.н., зав. лаб.


Н.Д. Озернюк

подпись, дата

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, д-р биологических наук, профессор



подпись, дата

Н.Д. Озернюк (введение, раздел 2 заключение)

Ведущие исполнители темы:
Доктор биол. наук



подпись, дата

А.А. Зотин (раздел 1)

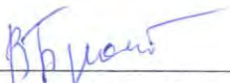
Кандидат биол. наук



подпись, дата

А.М. Красный (раздел 3)

Доктор биол. наук, профессор



подпись, дата

В.А. Бродский (раздел 4)

Доктор биол. наук, профессор



подпись, дата

В.П. Ямскова (раздел 5)

УДК 612.64

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	5
Ключевые слова	5
Введение	7
Раздел 1. Особенности энергетического метаболизма и роста в онтогенезе и механизмы метаболического гомеостаза	9
1.1. Сравнительный аспект динамики роста и энергетического метаболизма в онтогенезе животных, развивающихся в разных условиях (оптимальных и субэкстремальных) среды	9
Ключевые слова	9
Объекты исследований	9
Материалы и методы	9
Результаты и обсуждение	10
1.2. Особенности механизмов термостабильности белков полученных из разных организмов	26
Ключевые слова, сокращения и обозначения	26
Введение	26
Материалы и методы	27
Результаты и обсуждение	27
Заключение	29
Список цитируемой литературы по теме	29
Список основных публикаций по теме (раздел 1)	30
Раздел 2. Влияние острой гипоксии на энергетический обмен и сократительную активность мышц позвоночных животных.	33
Ключевые слова, сокращения и обозначения	33
2.1. Изучение возрастных особенностей влияния длительной гипоксии высокого уровня (5% кислорода) на двигательную активность куриного зародыша	33
Введение	33
Материалы и методы	34
Результаты и обсуждение	35
2.2. Исследование изолированных мышц куриного зародыша при острой гипоксии	37
Введение	37
Материалы и методы	37
Результаты и обсуждение	38
Список цитируемой литературы по теме	41
Список основных публикаций по теме (раздел 2)	41

Раздел 3. Регуляция метаболизма в норме и при нарушениях гомеостаза	42
Раздел 3.1. Кальциевая сигнализация в мышечной ткани.	42
Введение	42
Материалы и методы	42
Результаты и обсуждение	44
Заключение	46
Список цитируемой литературы	46
Раздел 3.2. Исследование механизмов секреции матриксных металлопротеиназ клетками эндометрия человека, являющихся причиной развития заболевания эндометриоза	47
Введение	47
Материалы и методы	47
Результаты и обсуждение	49
Список основных публикаций по теме (раздел 3)	50
Раздел 4. Сигнальные факторы организации клеточных популяций. Влияние дофамина на кинетику синтеза белка	52
Ключевые слова	52
Введение	52
Материалы и методы	52
Результаты и обсуждение	54
Список основных публикаций по теме (раздел 4)	56
Раздел 5. Исследование регуляторных белков, выделенных из тканей млекопитающих: биорегуляторы органного и тканевого гомеостаза, биологически активные в сверхмалых дозах	57
Введение	57
Материалы и методы	57
Результаты и обсуждение	57
Заключение	60
Список основных публикаций по теме (раздел 5)	61
Заключение по теме	63

РЕФЕРАТ

Отчет: 63 с., разделов 5, 20 рис., 3 таб., 26 источников, 53 публикации, 3 патента.

Ключевые слова: онтогенез, энергетический обмен, потребление кислорода, масса тела, рост, гипоксия, сердечный ритм, термостабильность, калориметрия, креатинкиназа, формиатдегидрогеназа, межклеточные взаимодействия, синхронизация функций, старение, синтез белка, гепатоциты, кератиноциты, дофамин, глутаминовая кислота, моллюски, птицы, млекопитающие, сателлитные клетки, скелетные мышцы крысы, клеточные культуры.

При изучении регуляции метаболического и клеточного гомеостаза в индивидуальном развитии животных было показано, что уровень энергетического метаболизма значительно возрастает в процессе раннего онтогенеза и обусловлен температурой, при которой развивается организм, зависит от кислородных условий (наличия гипоксии), а также двигательной активности развивающегося зародыша. Изучены молекулярные и физиологические механизмы стабилизации процессов развития в области оптимальных температурных условий, а также влияние острой гипоксии. Показано формирование механизмов защиты от гипоксии в процессе эмбриогенеза птиц (курица) и у новорожденных крысят в течение первой недели постнатального развития. При изучении кальциевой сигнализации в мышцах крысы установлено, что важным источником поступления кальция в мышечные волокна служат сателлитные клетки. В этих клетках обнаружены потенциалзависимые кальциевые каналы L типа Cav1.3, обеспечивающие поступление Ca^{2+} в мышечное волокно. Для анализа нарушений метаболического гомеостаза была изучена секреция матриксных металлопротеиназ в клетках эндометрия человека. В этих клетках впервые обнаружены $\alpha 7$ -никотиновые ацетилхолиновые рецепторы ($\alpha 7nAChRs$), которые вызывают импульсную секрецию матриксных металлопротеиназ-9, высвобождающихся из везикул, расположенных в субмембранном пространстве клеток. Секреция этих металлопротеиназ служит началом развития эндометриоза.

При изучении клеточных ритмов в культуре гепатоцитов впервые показано дезорганизующее клеточную популяцию действие дофамина. Нейротрансмиттер дофамин, добавленный в среду с первичными культурами гепатоцитов, ликвидирует ритм синтеза белка, т.е. десинхронизирует клеточную популяцию, прекращает межклеточные взаимодействия. Сходные данные были получены также для глутаминовой кислоты в культуре гепатоцитов и *in vivo*. В отличие от других экзогенных организующих факторов, глутаминовая кислота проникает через гематоэнцефалический барьер в мозг и, следовательно, может влиять на кинетику синтеза белка и организацию клеток нервной системы. В совместном исследовании активности протеасом показано, что кинетика синтеза белка в гепатоцитах зависит не только от собственно синтеза, но также от распада белков и их секреции из клеток.

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) в сверхмалых дозах влияют на вязко-упругие свойства плазматической мембраны млекопитающих *in vitro*, а также проявляют выраженное протекторное действие на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, которое имеет тканеспецифический, но не видоспецифический характер. На экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что МГТБ стимулируют восстановление и регенерацию в патологически измененных тканях. На основе биорегуляторов данной группы разработаны препараты, которые можно применять в регенеративной медицине.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов формирования метаболического и клеточного гомеостаза имеет важное значение, так как позволяет понять основные закономерности индивидуального развития, его стабильность и адаптации развивающихся организмов к условиям среды. Ранее нами были получены важные результаты, определившие направление планируемых исследований. Были выявлены механизмы воздействия различных условий развития (температуры, острой и хронической гипоксии) на развитие, выживаемость зародышей, энергетический метаболизм и адаптационный потенциал растущих организмов (раздел 1.1).

Термостабильность гомологичных белков, меняющаяся на разных стадиях онтогенеза, а также при адаптациях к разным температурам среды и отличающаяся у обитателей различных широт, имеет общие молекулярные механизмы, которые определяются в первую очередь структурой белков. Эти вопросы изучались на модельных объектах: гистонopodobных НУ-белках микроорганизмов, формиатдегидрогеназе из разных источников, а также бычьим сывороточном альбумине как модели для анализа агрегации белков. Методами сканирующей калориметрии, кругового дихроизма и сайт-направленного мутагенеза было показано, мутации, приводящие к определенным аминокислотным заменам, существенным образом меняют структурные, термодинамические и каталитические свойства гомологичных белков (гистонopodobных НУ-белках, формиатдегидрогеназе), полученных из разных источников, что согласуется с изменением термостабильности белков в онтогенезе и при температурных адаптациях (раздел 1.2).

Было изучено влияние острой гипоксии на сократительную активность эмбриональных мышц, частоту сердечных сокращений и потребление кислорода у кур, а также новорожденных крысят в течение первой недели постнатального развития. При изучении циклической моторики мышц (*m. tibialis anterior*) зародышей кур при действии 10% O₂ гипоксии показана зависимость данного процесса от инсулина и оуабаина, которые ингибировали двигательную активность, что свидетельствует об участии в этих процессах мембранной Na⁺/K⁺-АТФазы. Острая гипоксия вызывает угнетение энергетического метаболизма у новорожденных крысят в течение первой недели постнатального развития. Потребление кислорода в течение первых 4-5 суток развития новорожденных животных ингибируется в большей степени, чем на более поздних сроках постнатального развития. Таким образом, переход от гипоксической чувствительности к относительной толерантности начинается в течение первой недели после рождения. (раздел 2)

Существенную роль в регуляции метаболического и клеточного гомеостаза играет кальциевая сигнализация, изучаемая нами на примере сателлитных клеток скелетных мышц крыс, миобластов и мышечных волокон. Впервые показано, что поступление Ca²⁺ в мышечное волокно наиболее интенсивно протекает в районе сателлитных клеток, локализованных преимущественно

в зоне моторных бляшек. Параллельно проводились исследования нарушения внутриклеточного гомеостаза на примере эндометрия в норме и при патологии. Повышение секреции этого типа металлопротеиназ приводит к развитию эндометриоза и рассматривается в качестве начального звена нарушения внутриклеточного гомеостаза (раздел 3).

Прямые взаимодействия клеток определяют образование и выделение в межклеточную среду специфических сигнальных факторов, от которых зависит дифференциальная активность генов на разных этапах индивидуального развития, постнатальных дифференцировок, регенерации (эффекты «ниши»). На регуляцию функций дифференцированных клеток также влияют сигнальные факторы микроокружения. Эти факторы являются предметом наших исследований, которые проводятся на различных клеточных культурах (раздел 4).

Исследование новых механизмов биорегуляции в живых организмах - актуальная проблема современной биологии. В различных тканях животных (позвоночных и беспозвоночных), растений, грибов нами были обнаружены биорегуляторы, которые в низких дозах влияют на основные биологические процессы – миграцию, адгезию, дифференцировку, пролиферацию клеток. Биологическое действие биорегуляторов данной группы характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Данные биорегуляторы, локализованные в межклеточном пространстве, имеют сложное строение и состоят из биологически активных небольших пептидов и белков, модулирующих их активность. На основании общности физико-химических свойств и характера биологического действия биорегуляторы были выделены в отдельную группу – мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов - МГТБ (раздел 5).

Планируемые исследования механизмов гомеостаза индивидуального развития на молекулярном и клеточном уровнях, а также на уровне организма по своим концептуальным и методическим подходам соответствуют международным критериям, принятым в этих областях. Актуальность данных работ не вызывает сомнений.

Раздел 1. ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОСТА В ОНТОГЕНЕЗЕ И МЕХАНИЗМЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА.

1.1. Сравнительный аспект динамики роста и энергетического метаболизма в онтогенезе животных, развивающихся в разных условиях (оптимальных и субэкстремальных) среды.

Ключевые слова: рост, масса тела, плотность популяции, термодинамика живых систем, онтогенез, энергетический обмен.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовали следующие виды животных, которые отличаются температурными условиями обитания: большой прудовик *Lymnaea stagnalis* (Lymnaenidae, Gastropoda), живородящая лужанка *Viviparus viviparus* (Vivipariidae, Gastropoda), два вида литторин *Litorina saxatilis*, *L. littorea* (Littorinidae, Gastropoda), роговая катушка *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Gastropoda), пресноводная жемчужница *Margaritifera margaritifera* (Margaritiferidae, Bivalvia).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерение скорости потребления кислорода.

Измерения проводили электродным методом с помощью оксиметра Orion Star A223 RDO/DO portable meter ("Thermo Fisher Scientific", USA). Интенсивность дыхания вычисляли путем деления скорости потребления кислорода на массу тела.

Определение возраста моллюсков из природных популяций. Возраст собранных животных определяли на основании учета меток зимовок, присутствующих на раковинах брюхоногих моллюсков в виде глубоких рельефных линий, а на раковинах двустворчатых моллюсков – в виде годовых колец.

Исследование зародышевого развития *Planorbarius corneus*.

Для определения стадий зародышей и их размеров проводили микровидеосъемку кладок в течение всего периода развития под стереоскопическим микроскопом МБИ-10 (Россия) с помощью цифровой видеокамеры DCM800 (Micromed, Russia) и программного обеспечения ScopePhoto software (version 3.1.386, ScopeTek, China). Размеры зародышей определяли путем измерения их изображений с использованием программы Excel с точностью 1 мкм. Приблизительный объем зародышей вычисляли по формуле объема эллипсоида: $V = \pi l d h/6$, где V – объем зародыша, l , d , h – длина, высота и ширина зародыша соответственно.

Изучение влияния гипомагнитного поля на зародышевое развитие *P. corneus*.

Изменение напряженности магнитного поля достигали с помощью гипомагнитной камеры, представляющей собой открытую с одной стороны трубу, покрытую изнутри изолирующим магнитное поле материалом. Родительских особей *P. corneus* размером около 500 мг, выросших в

аквариальных условиях при нормальном геомагнитном поле, содержали либо в гипомагнитной камере (10 особей), либо в нормальных условиях (12 особей). Через 1.5 мес. моллюсков из гипомагнитной камеры перемещали в нормальные условия. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (около 23°C).

Для определения избираемой индукции магнитного поля ювенильными *P. corneus*. использовали 2 группы моллюсков, различающихся по условиям, в которых проходило развитие с момента откладки зигот и до момента проведения эксперимента: 1-ая группа - нормальные условия (72 особи в возрасте 2-3 мес.); 2-ая группа - условия гипомагнитной камеры (31 особь в возрасте 1-2 мес.).

Расчеты. Первичные данные сглаживали с помощью кубических сплайнов при мощности сглаживания 0.8. Вычисления проводили с помощью программы Matlab (версия 7.3.0.267, разработана компанией The MathWorks, Inc, США). Анализ основного тренда и волновых компонент проводили с использованием программы "Гусеница" (версия 3.40, разработана компанией GistaT Group, Россия) для каждой особи отдельно.

Рост и изменение интенсивности дыхания аппроксимировали предложенным нами уравнением, частным случаем которого является уравнение Берталанфи: $dZ/Zdt = V_0(1-a)^t$. Взаимозависимость между измеренными параметрами описывали аллометрическим уравнением: $Y(X) = aX^k$.

Возможность использования уравнений оценивали с помощью критерия нелинейности. Значения коэффициентов уравнений и достоверность их различия определяли с помощью регрессионного анализа. При сравнении средних величин использовали однофакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Рост и скорость потребления кислорода у прудовика *Lymnaea stagnalis*.

Наличие биоритмов становится очевидным уже при анализе кинетики удельной скорости роста и интенсивности дыхания в индивидуальном развитии *L. stagnalis* (рис. 1а). При этом основная зависимость, выделенная с помощью сингулярного спектрального анализа, практически не отличается от кривой, полученной после аппроксимации уравнением Берталанфи для всех исследованных особей.

Более отчетливыми биоритмы становятся после выделения волновой составляющей. Период колебаний удельной скорости роста широко варьирует, а изменение амплитуды колебаний не обнаруживает какой-либо выраженной закономерности (рис. 1б,в).

Анализ временного ряда удельной скорости роста методом сингулярного спектрального анализа показал, что начиная с 10-й нед после вылупления, закономерные периодические

изменения представлены двумя эндогенными биоритмами удельной скорости роста с периодами 10.3 нед и 6.5 нед и двумя эндогенными биоритмами интенсивности потребления кислорода с периодами 10.3 и 7.2 нед. Локальные максимумы биоритмов у разных особей приходятся на одни и те же возраста, а их периоды приблизительно одинаковы у всех исследованных животных и остаются неизменными на протяжении индивидуального постларвального развития. Биоритм с периодом 10.3 нед – затухающий, его амплитуда уменьшается от 3.2 год^{-1} (в возрасте 10 нед) до 0.8 год^{-1} (к моменту гибели моллюсков). Биоритмы с периодом 6.5 и 7.2 нед – не затухающие и имеют среднюю амплитуду 0.8 год^{-1} и $2.4 \text{ мкл O}_2/(\text{ч}\cdot\text{г})$.

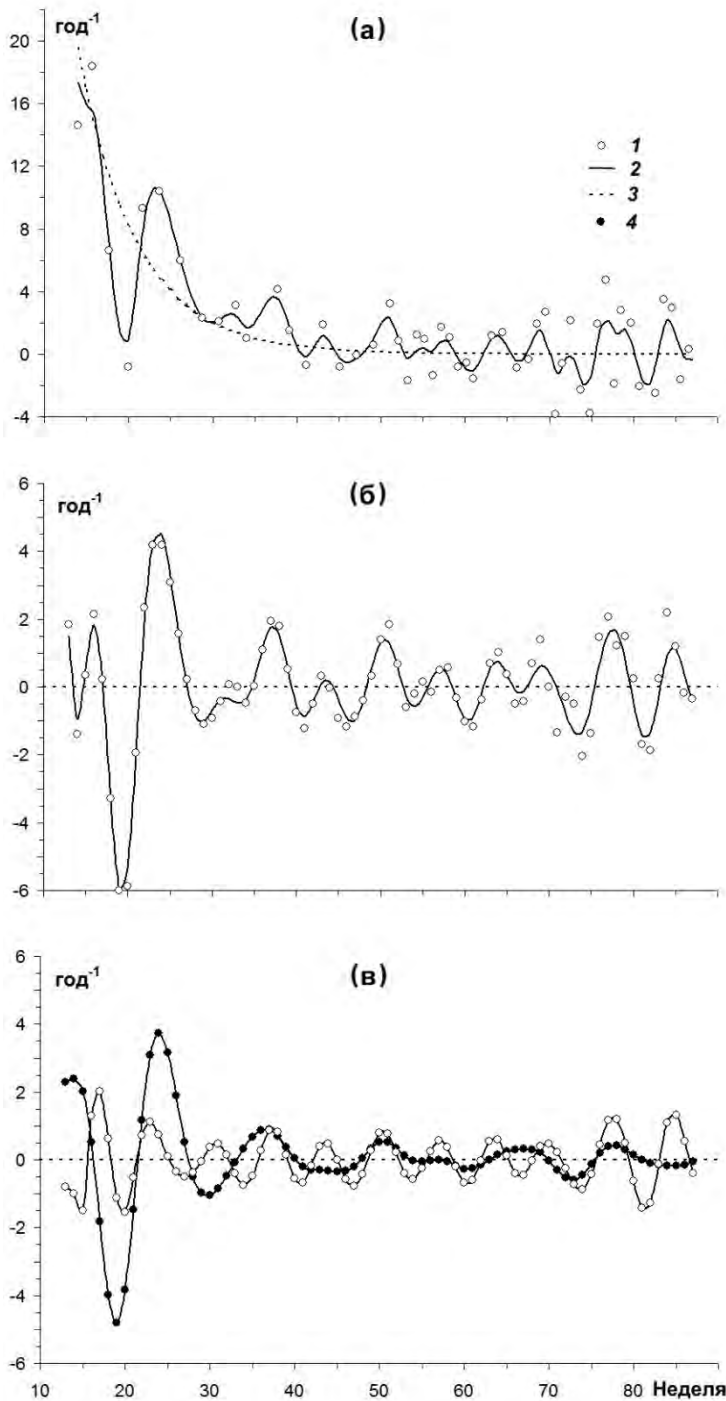


Рис. 1. Разложение временного ряда удельной скорости роста (моллюск № 2). а – изменение удельной скорости роста. 1 – исходный временной ряд, 2 – сглаживание кубическим сплайном, 3 – основной тренд (аппроксимация уравнением Бергаланфи). б – волновая составляющая удельной скорости роста. 1 – разница между значениями, полученными после сглаживания кубическим сплайном и аппроксимации уравнением Бергаланфи (рис. 1а), 2 – сумма биоритмов, представленных на рис. в. в – разложение волновой составляющей (рис. 1б). 1 – биоритм с периодом 6.5 нед; 4 – биоритм с периодом 10.3 нед. По оси ординат: а – удельная скорость роста; б и в – отклонение от основного тренда (3). По оси абсцисс – возраст после вылупления.

2. Зависимость между линейными параметрами раковины у живородящей лужанки *Viviparus viviparus*.

Проведенные расчеты свидетельствуют о невозможности применения одного аллометрического уравнения для описания относительного роста размеров раковины *V. viviparus* на протяжении всего онтогенеза, поскольку зависимость между логарифмами измеренных параметров оказывается достоверно нелинейной ($p < 0.01$) или в процессе онтогенеза наблюдается достоверное изменение величины коэффициентов k . Более того, значения коэффициента k , выражающие зависимости между высотой раковины, диаметром раковины и высотой завитка у взрослых животных разного пола различны.

3. Скорость потребления кислорода у литорин *Litorina saxatilis* и *L. littorea*.

Скорость потребления кислорода взрослыми литоринами в воздушной среде выше, чем в воде. Разница уменьшается с уменьшением массы (рис. 2). Это связано с тем, что зависимость между скоростями потребления кислорода на воздухе и воде описывается аллометрическим уравнением со степенным коэффициентом k , отличным от 1.

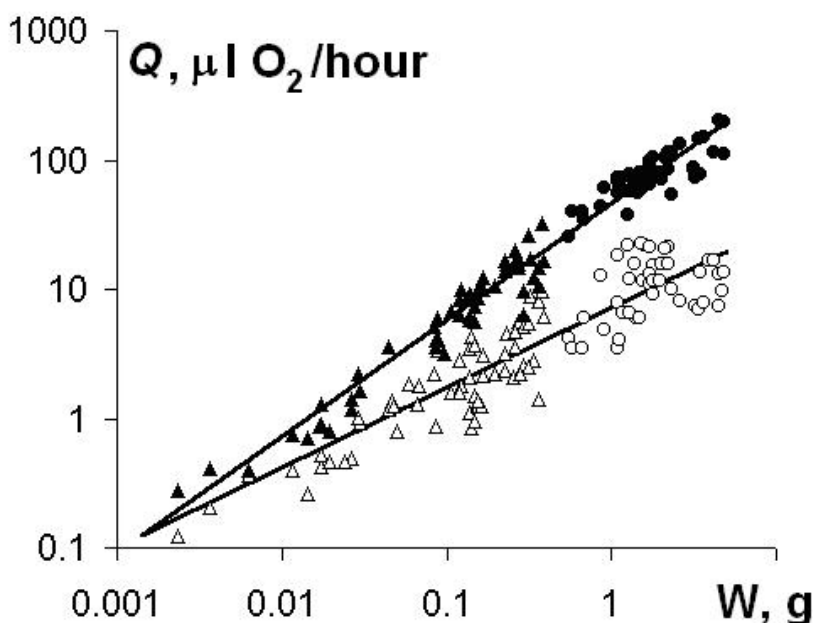


Рис. 2. Зависимость скорости потребления кислорода от массы тела у моллюсков рода *Littorina*. Кружки - *L. littorea*, треугольники - *L. saxatilis*. Белые символы - скорость потребления кислорода в воде, черные - скорость потребления кислорода на воздухе. Линии - аппроксимация аллометрической зависимостью.

Соответственно различаются степенные коэффициенты зависимостей скорости потребления кислорода от массы в воздушной и водной средах. Если экстраполировать обе зависимости в сторону меньших масс, то окажется, что для моллюсков с общей массой около 1 мг и высотой раковины около 1.5 мм скорости дыхания на воздухе и в воде будут равны (рис. 2). Скорость потребления кислорода взрослыми животными в воздушной среде при ограничении их подвижности снижается на 30%, но все еще остается достоверно выше ($p < 0.001$) по сравнению со скоростью потребления кислорода в водной среде. Двигательная активность объясняет разницу между дыханием в воздушной и водной среде лишь частично.

4. Неравномерность относительного роста раковин *Margaritifera margaritifera*.

При определении роста раковины в ширину существенное значение имеет начальная точка, относительно которой производятся измерения. Обычно в качестве такой начальной точки используют точку, наиболее удаленную от вентрального края раковины, лежащую вблизи ее макушки. Однако в связи с сильной коррозией макушки у моллюсков семейства Margaritiferidae положение начальной точки оказывается различным у разных особей. При этом наблюдается сильная зависимость отношения ширины раковины к ее длине (H/L) от возраста моллюска. Таким образом, возникает необходимость определения такой начальной точки, измерения относительно которой дают независимую от возраста величину H/L и позволяют сравнивать различные особи между собой. Логично назвать такую точку (H_0) точкой пропорциональности. Начальная точка лежит на прямой, вдоль которой осуществляются измерения ширины раковины, на расстоянии H_0 от исходной точки измерения (вне раковины, если $H_0 > 0$, или внутри изображения раковины – в противном случае).

Коэффициенты регрессии b зависимости $H(L)$ можно трактовать как независимое от возраста соотношение высоты и длины раковины после учета поправочного коэффициента H_0 . У разных особей значения этих коэффициентов широко варьируют от 0.379 до 0.585 и достоверно отличаются друг от друга ($p < 0.001$).

Условно всех моллюсков можно разделить на 7 групп, в пределах каждой из которых значения b достоверно не различаются (n – объем выборки):

1. $b = 0.385 \pm 0.009$; $n = 53$ (особи № 19, 27).
2. $b = 0.450 \pm 0.007$; $n = 86$ (особи № 7, 33, 42).
3. $b = 0.476 \pm 0.007$; $n = 282$ (особи № 2, 8, 10, 17, 18, 25, 29, 32, 40).

4. $b = 0.504 \pm 0.007$; $n = 203$ (особи № 1, 3, 11, 12, 14, 28).

5. $b = 0.534 \pm 0.007$; $n = 100$ (особи № 5, 13, 31, 39).

6. $b = 0.559 \pm 0.006$; $n = 52$ (особи № 9, 34).

7. $b = 0.585 \pm 0.005$; $n = 24$ (особь № 30).

Статистическое распределение, составленное из значений b , рассчитанных для отдельных особей, достоверно не отличается от нормального. Средняя величина для этого распределения составляет $b = 0.492 \pm 0.009$; $n = 27$.

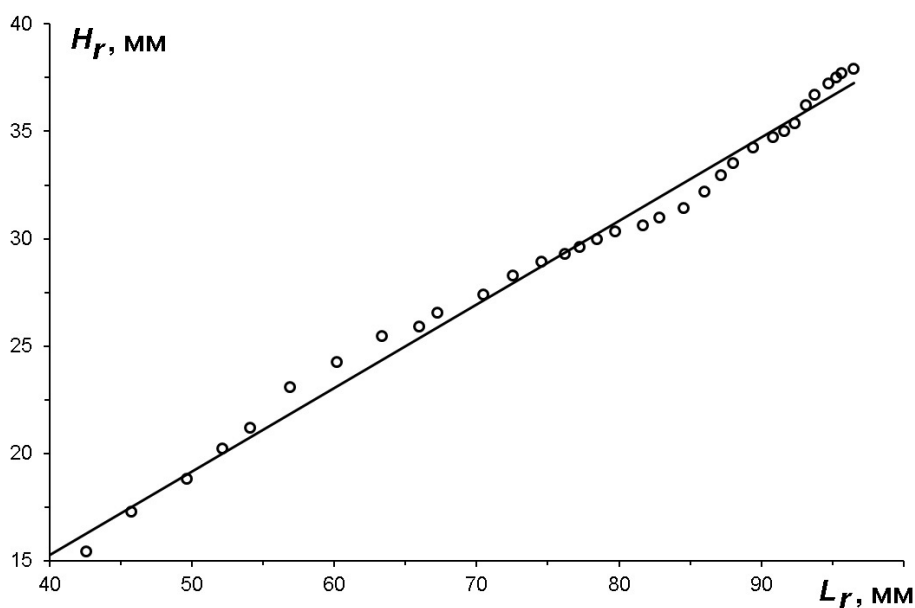


Рис. 3. Пример зависимости высоты годового кольца (H_r) от его длины (L_r) в течение индивидуального развития *M. margaritifera*.

Из рис. 3 видно, что отклонения от прямой регрессии не хаотичны, а имеют вполне закономерный ритмический характер. Для характеристики отклонения величины H_r от прямой мы ввели индекс относительного отклонения $\Delta H\%$.

Результаты сингулярного спектрального анализа показывают, что ритмичность отклонения экспериментальных значений от ожидаемых по аллометрическому уравнению наблюдается у всех исследованных особей и имеет сходный характер. В целом изменение относительного отклонения идет волнообразно (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что периоды колебаний $\Delta H\%$ у разных особей различны и распадаются на 2 группы со средними значениями 15.8 ± 0.1 года ($n = 14$); 24.6 ± 0.2 года ($n = 13$) соответственно. Другие измеренные параметры варьируют не так сильно. Возраст достижения первого локального максимума изменяется от 15 до 23 лет и составляет в среднем

17.3 ± 0.1 года ($n = 27$). Амплитуда варьирует незначительно. Ее средняя величина равна $1.66 \pm 0.02\%$ ($n = 27$).

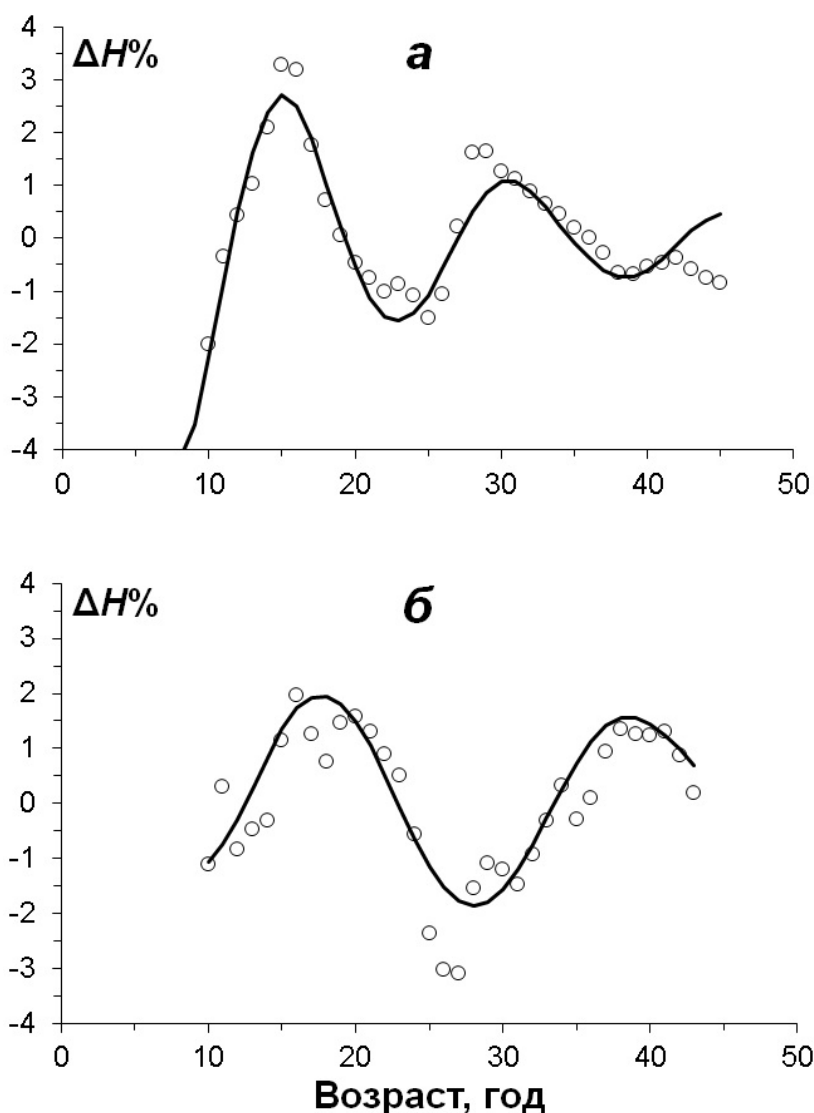


Рис. 4. Примеры зависимости $\Delta H\%$ от возраста моллюсков. Кружки – экспериментальные данные; сплошная линия – основной тренд, определенный методом сингулярного спектрального анализа. *a* – моллюск № 1 (период 16 лет); *б* – моллюск № 11 (период 22 года).

5. Рост зародышей роговой катушки *Planorbarius corneus*.

Полученные данные по изменению линейных размеров зародышей *P. corneus* позволяют разделить весь эмбриогенез на 4 стадии в зависимости от параметров единого уравнения роста (1):

1. Уменьшение размеров зародышей (стадии дробления).
2. Постоянные размеры (стадии бластулы, гаструлы и ранней трохофоры).
3. Синхронный рост (стадии средней и поздней трохофоры).
4. Асинхронный рост (стадии велигера, великонхи, ползающего и вылупляющегося зародыша).

На ранних этапах развития от начала откладки зигот и вплоть до начала стадии средней

трохофоры все исследованные кладки развиваются синхронно и зародыши имеют приблизительно одинаковые размеры для одних и тех же возрастов, выраженных в биологических единицах времени (рис 5). На стадии ранней бластулы размеры зародышей стабилизируются на уровне 110 ± 1 мкм и остаются постоянными вплоть до стадии средней трохофоры (рис 5). Наблюдаемые колебания размеров в этот период не отличаются от стохастического шума. Этот тип динамики размеров зародышей также может быть описан единым уравнением.

В зародышевом развитии *P. corneus*, как и у других легочных моллюсков, личиночные стадии проходят внутри кладок. Последовательно формируются две личинки: трохофора и велигер. Рост зародышей начинается со стадии средней трохофоры. Размеры зародышей увеличиваются синхронно как в пределах кладок, так и в разных кладках. Средние размеры по всем исследованным кладкам приведены на рис. 6.

Оценка единого уравнения роста дает значения $c = 1.037 \pm 0.006$; $d = 12.1 \pm 6.5$ мм. Достоверное отличие коэффициента c от 1 ($p < 0.001$) свидетельствует о том, что на личиночных стадиях рост зародышей идет по экспоненциальному типу.

Постличиночные стадии начинаются со стадии великонхи, когда велигер перестает свободно передвигаться внутри капсулы, прикрепляется к стенке капсулы, и начинается окончательный метаморфоз зародыша. Окончание метаморфоза детектируется по изменению характера двигательной активности зародышей: перемещение великонхи происходит путем отрыва зародыша от поверхности капсулы с последующим его прикреплением к капсуле в другом месте, тогда как прошедший метаморфоз зародыш в связи с окончанием формирования мышечной системы постоянно ползает по поверхности капсулы. Начало стадии вылупляющего зародыша определяется по возрасту выхода из капсулы первого зародыша.

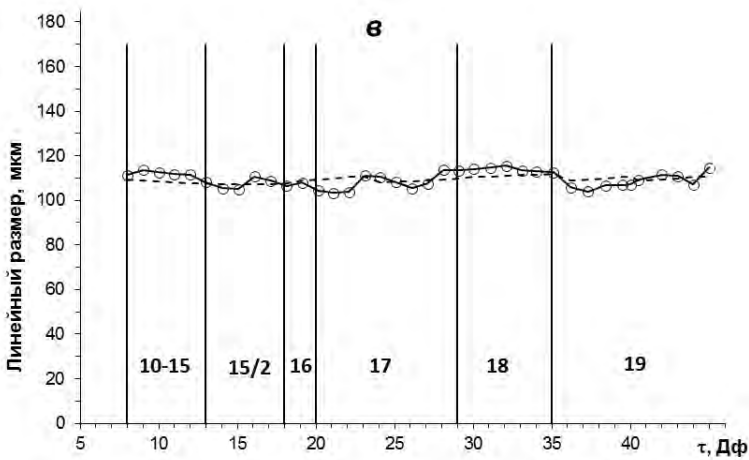
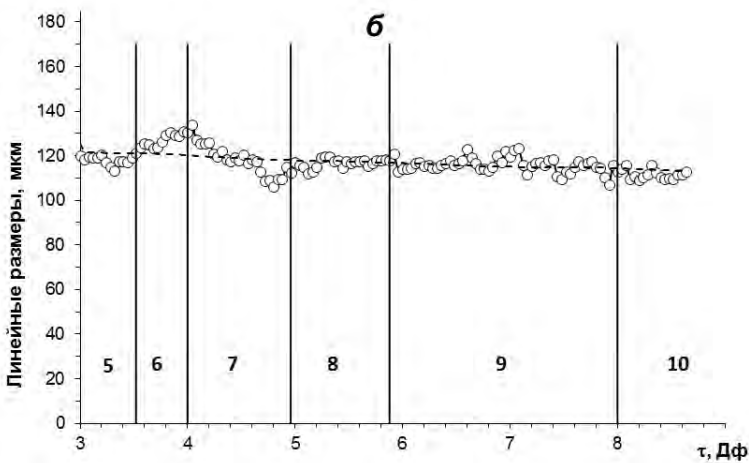
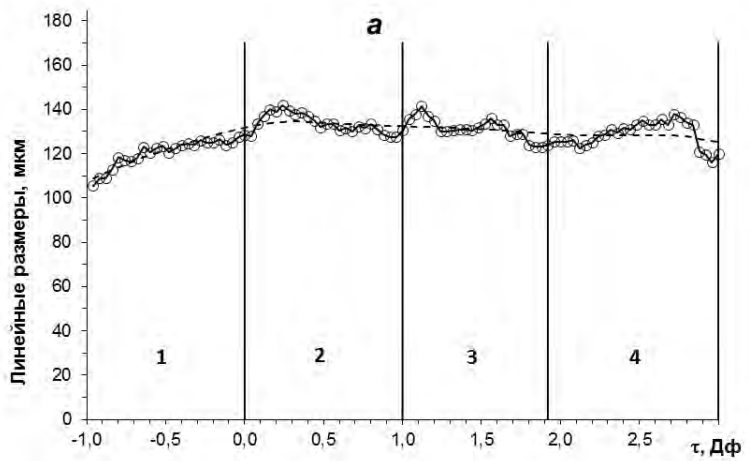


Рис. 5. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на ранних стадиях развития. По оси абсцисс – биологическое время (Дф). *а* – стадии синхронного дробления; промежуток между измерениями 0.04 Дф. *б* – стадии асинхронного дробления; промежуток между измерениями 0.04 Дф. *в* – стадии от бластулы до ранней трохофоры; промежуток между измерениями 1 Дф. Цифры – номера стадий: **1** – зигота; **2** – 2 бластомера; **3** – 4 бластомера; **4** – 8 бластомеров; **5** – 12 бластомеров; **6** – 16 бластомеров; **7** – 24 бластомера; **8** – 29 бластомеров; **9** – поздняя морула; **10-15** – бластула; **15/2** – уплощенная бластула; **16** – ранняя гастрюла; **17** – средняя гастрюла; **18** – поздняя гастрюла; **19** – ранняя трохофора. Кружки – экспериментальные данные. Сплошные вертикальные линии – границы стадий. Пунктирные линии – основной тренд, выделенный методом сингулярного спектрального анализа.

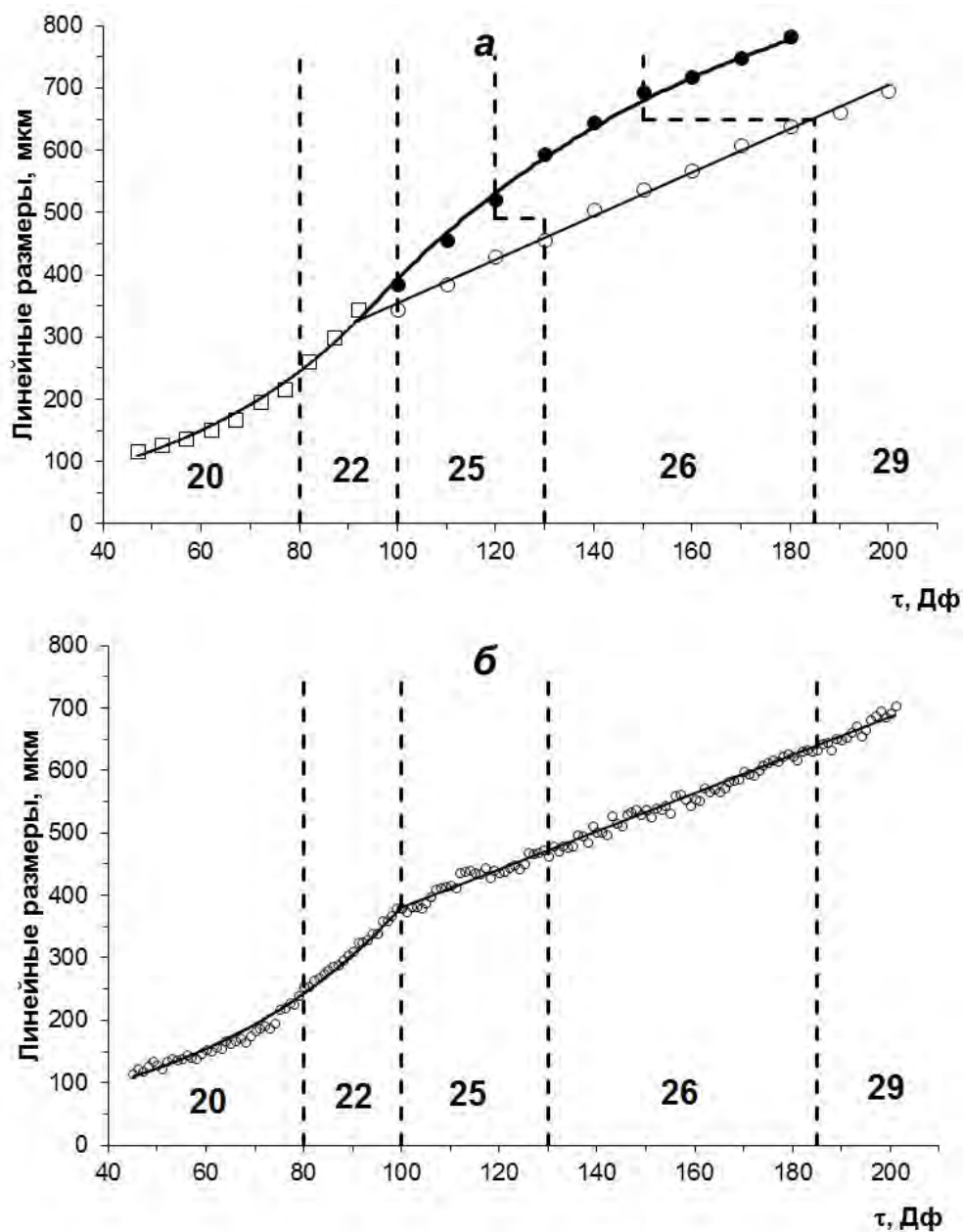


Рис. 6. Изменение линейных размеров зародышей *P. corneus* на личиночных и постличиночных этапах развития. По оси абсцисс – биологическое время (Дф). *а* – средние размеры по всем кладкам; промежуток между измерениями 5 Дф для личиночных стадий, 10 Дф – для постличиночных стадий. Квадраты – личиночные стадии; белые кружки – средние размеры зародышей, с замедленным ростом (тип роста I); черные кружки – средние размеры зародышей, с ускоренным ростом (тип роста II). *б* – средние размеры для зародышей кладки № 14; промежуток между измерениями 1 Дф. Сплошные линии – аппроксимация единым уравнением роста (1); пунктирные линии – границы стадий. Цифры – номера стадий: **20** – трохофора; **22** – велигер; **25** – великонха; **26** – ползающий зародыш; **29** – вылупляющийся зародыш.

Для анализа роста мы учитывали только тех зародышей, выход которых из капсул был детектирован. В пределах одной кладки наблюдался синхронный рост таких зародышей. Диапазон возрастов от начала до окончания выхода ювенильных моллюсков из капсул составлял не более 10 Дф (10 час при 25°C).

Сразу после начала метаморфоза скорость роста резко изменяется и дальнейшее изменение размеров идет по одной из двух кривых, которые можно условно обозначить как замедленный (I тип роста) и ускоренный (II тип роста).

Для одной и той же стадии развития при ускоренном росте зародыши крупнее по сравнению с зародышами, растущими по замедленному типу. Стадии развития при ускоренном росте достигаются раньше, чем при замедленном типе. Это позволяет говорить об асинхронности изменения размеров в период от начала метаморфоза до вылупления. Средние размеры вылупившихся зародышей и средний возраст вылупления для двух типов роста различаются с высокой степенью достоверности. Динамика изменения средних размеров зародышей для двух типов роста приведена на рис. 6.

Оценка коэффициента с единого уравнения для этого типа роста дает значение достоверно не отличающееся от 1: $c = 0.996 \pm 0.003$. То есть зависимость длины зародышей от возраста может быть описана линейным уравнением со средними значениями коэффициентов $V_0 = 3.51 \pm 0.08$ мкм/Дф; $Z_0 = 3.3 \pm 11.7$ мкм.

Ускоренный рост наблюдается у зародышей из кладок № 1, 8, 9, 10 и 13. Значения коэффициентов единого уравнения составляют $c = 0.986 \pm 0.004$; $d = 126 \pm 17$ мм. Коэффициент c достоверно отличается от 1. Таким образом, кривая роста имеет горизонтальную асимптоту $Z_\infty = 9000$ мкм и соответствует зависимости, описываемой уравнением Берталанффи.

6. Влияние изменения магнитного поля на развитие роговой катушки *Planorbarius corneus*.

Тератогенные эффекты.

Зародыши в интактных кладках развиваются нормально, независимо от того, помещены ли кладки в гипомагнитную камеру на стадии зиготы, двух бластомеров или отложены в гипомагнитных условиях. Большинство зародышей вылупляются в обычные сроки. Погибло только 2 зародыша: один - на стадии великонхи и один на стадии ползающего зародыша. То есть, погибло 0.5% зародышей. Следует отметить, что эта величина существенно ниже, чем доля зародышей, гибнущих в стандартных условиях развития. По нашим неопубликованным данным тератогенные эффекты в нормальных условиях, варьируют в зависимости от температуры. Минимальное количество зародышей гибнет или отстает в развитии при 25°C (около 4%), при неоптимальных температурах (15°C или 33°C гибель может достигать 60%). Таким образом, гипомагнитные условия являются более благоприятными для эмбрионального развития роговой катушки, чем условия нормального геомагнитного поля.

При перемещении кладок из гипомагнитной камеры в нормальные условия все зародыши в течение суток погибают, не зависимо от их стадии развития: трохофоры – 8 экз. (1 кладка);

велигера – 8 экз. (1 кладка); великонхи – 23 экз. (3 кладки); ползающего зародыша – 27 экз. (3 кладки); вылупляющегося зародыша - 40 экз. (4 кладки).

*Рост и жизнеспособность ювенильных *P. corneus* в гипомагнитных условиях и при их перемещении в нормальные условия.*

В гипомагнитных условиях все моллюски росли по стандартной кривой роста, не отличающейся от кривой роста при 20-25°C в нормальных условиях. Перемещение животных из гипомагнитной камеры и обратно для осуществления взвешивания не оказывало заметного влияния на их рост.

После перемещения моллюсков в нормальные условия скорость роста у всех особей резко снижается практически до полного прекращения роста. Большинство моллюсков погибает. К возрасту 28 нед. (5 нед. после перемещения в нормальные условия) в живых осталось 4 особи из 12 (33%), а к возрасту 33 нед выжил только один моллюск.

*Жизнеспособность и плодовитость половозрелых *P. corneus* при перемещении в гипомагнитные условия и обратно.*

Все половозрелые моллюсков на протяжении всего срока исследования оставались живыми как в экспериментальных, так и в контрольных условиях.

Достоверного различия в плодовитости также не обнаружено. В период содержания в гипомагнитной камере она составила 0.48 кладок на особь в сут; после перемещения животных из гипомагнитных условий в нормальные – 0.65 кладок на особь в сут; при содержании в нормальных условиях – 0.54 кладок на особь в сутки

*Избираемая ювенильными *P. corneus* индукция магнитного поля.*

Большинство моллюсков, выросшие в нормальных условиях выбирают зону, находящуюся вне гипомагнитной камеры. При наличии пищи животные отдают предпочтение питанию, при этом выбирая зону с кормом, наиболее близкую к выходу из гипомагнитной камеры, то есть зону с максимальной индукцией.

Моллюски, выросшие в гипомагнитных условиях, наоборот, в течение суток мигрируют вглубь камеры. Основное их количество избирает наиболее удаленную от выхода из гипомагнитной камеры зону, то есть зону с минимальной индукцией.

Суммируя полученные результаты, необходимо отметить, что снижение магнитного поля в целом оказывает благотворное воздействие на развитие *P. corneus*. Зародыши, изначально оказавшиеся в гипомагнитных условиях, характеризуются пониженной смертностью.

Однако изменению индукции в сторону увеличения оказывает серьезное патологическое воздействие на животных: зародыши при этом быстро гибнут, а ювенильные моллюски практически прекращают рост и большинство их также погибает. Для половозрелых моллюсков изменения жизнеспособности и плодовитости не выявлено.

Обнаружены следующие эффекты воздействия гипوماгнитных условий на развитие *P. corneus*:

1. Снижается подвижность зародышей на стадии трохофоры. Вероятно это связано с изменениями работы ресничного эпителия или с нарушениями формирования.

2. На стадии поздней великонхи в гипوماгнитных условиях увеличивается количество перемещений зародышей с одного места на внутренней поверхности капсулы на другое по сравнению с ранней великонхой, в то время как в нормальных условиях этот параметр снижается. Возможно, в гипوماгнитных условиях нарушается степень сцепления подошвы ноги великонхи с поверхностью капсулы. Проверка этой гипотезы требует дополнительных исследований.

3. Как уже отмечалось в гипوماгнитных условиях снижается доля тератогенных эффектов.

4. Резкое повышение индукции магнитного поля до нормального уровня приводит к гибели зародышей и большинства ювенильных моллюсков. Рост ювенильных моллюсков практически прекращается.

5. Избираемая ювенильными *P. corneus* индукция зависит от того, к каким условиям они были адаптированы. Моллюски, выросшие в условиях нормального геомагнитного поля, предпочитают условия с максимальной индукцией. Животные, выросшие в условиях гипوماгнитной камеры, наоборот, предпочитают условия с минимальной индукцией.

8. Объединенное уравнение роста животных.

Все наблюдаемые кривые роста могут быть разделены на 2 большие категории:

1. Бесконечный рост, при котором размеры животных постоянно увеличиваются. Такой рост наблюдается у большинства пойкилотермных животных.

2. Конечный рост, при котором размеры животных сначала достигают максимума, а затем постоянно снижаются. Такой рост характерен для гомойотермных и некоторых пойкилотермных животных.

Для каждой из этих категорий можно выделить несколько типов кривых роста в зависимости от характера нарастания размеров: экспоненциальный, параболический, линейный, замедляющийся и S-образный. Подробный анализ зависимостей массы тела (M) от возраста (t) животных, показал, что, для бесконечного роста могут быть выделены три основных уравнения:

1. Экспоненциальное уравнение:

$$M = B(1 + Ae^{k_g t})^{1/b}.$$

Все коэффициенты этого уравнения положительны.

2. Параболическое уравнение:

$$M = B(1 + At^{k_g})^{1/b}.$$

Важным частным случаем уравнения (2) является линейное уравнение, когда коэффициенты k_g и b равны 1.

3. Асимптотическое уравнение. Это уравнение, называемое уравнением роста Бергаланфи, используется наиболее часто:

$$M = M_{\infty}(1 - Ae^{k_g t})^{1/b},$$

$k_g < 0$; все остальные коэффициенты положительны. Если $0 < b \leq 1$, то уравнение (3) описывает замедляющийся асимптотический тип роста (выпуклая кривая без перегиба). Если $b > 1$, уравнение (3) описывает S-образный асимптотический тип роста с одним перегибом.

Оказывается, что все эти уравнения могут быть сведены к одному, которое описывает не только бесконечный рост, но и все наблюдаемые в природе типы роста.

Прежде всего, отметим, что все приведенные уравнения роста содержат степенной коэффициент b . Значение этого коэффициента в существенной степени зависит от того, какой параметр был использован для построения кривой роста. Так, при измерении линейных размеров коэффициент b в большом числе случаев не отличается от 1. При измерении массы тела он часто принимает значение, близкое к 1/3. Эти значения коэффициента b мы использовали при аппроксимации экспериментальных данных по линейному и весовому росту соответственно.

Параметры роста и ряд других биологических параметров часто связаны между собой степенной (аллометрической) зависимостью $Y = aX^b$, где Y, X – измеренные параметры; a, b – коэффициенты. Таким образом, если изменение какого-либо параметра роста может быть аппроксимировано одним приведенных выше уравнений, то изменение любого другого параметра, связанного с ним аллометрической зависимостью также может быть аппроксимировано этим же уравнением. Меняются лишь значения коэффициентов, в частности, коэффициента b . Очевидно, что каждый из таких параметров может служить для описания роста животных.

Так как степенной коэффициент аллометрического уравнения определяет, каким образом происходит изменение размеров тела друг относительно друга, то этот коэффициент логично связать не с ростом, а с другим процессом – морфогенезом. Нам кажется логичным для учета процессов морфогенеза при анализе "чистого" роста использовать параметр, аллометрически связанный с массой $Z \sim M^b$, где b – степенной коэффициент из уравнений роста. В этом случае уравнения приобретают наиболее простую форму: $Z = \frac{V_0}{\ln c}(c^t - 1) + Z_0$ для уравнений (1) и (3); $Z = V_0 t + Z_0$ для уравнения (2); Z_0, V_0 – значения параметра Z и скорости его изменения в начальный момент времени $t = 0$; c – коэффициент, определяющий изменение скорости роста.

Оба эти уравнения можно записать в дифференциальной форме одной формулой:

$$\frac{dZ}{dt} = \frac{dM^b}{dt} = V_0 c^t \quad (1)$$

(для линейного уравнения $c = 1$).

Вычисление значений коэффициентов уравнения (1) можно проводить с помощью рекуррентной формулы, аналогичной формуле Форда-Волфорда, обычно применяемой для уравнения Берталанфи:

$$Z_{t+m} = c^m Z_t + d. \quad (2)$$

Коэффициент V_0 из уравнения (1) рассчитывается по формуле $V_0 = (Z_0 - d) \ln(c)$, если $c > 0$ и $c \neq 1$; $V_0 = d/m$, если $c = 1$.

Графиком функции (2) в координатах $Z_{t+m}(Z_t)$ является вектор, начало которого имеет координаты $(Z_1; Z_{m+1})$, конец – $(Z_{t-m}; Z_t)$, где $Z_1; Z_{m+1}$ – первое и второе измерения; $Z_{t-m}; Z_t$ – предпоследнее и последнее измерения соответственно. Тип кривой роста легко можно определить на графике по положению и степени наклона вектора.

Сложнее обстоит дело в случае конечного роста. Мы считаем, что в этом случае уменьшение размеров тела после достижения максимума определяется самопроизвольным распадом организма, скорость которого пропорциональна массе тела животного. В связи с этим мы ввели при вычислении параметра "чистого" роста Z соответствующую поправку:

$$Z = [M \exp(vt)]^b, \quad (3)$$

где v – скорость самопроизвольного распада массы тела.

На рис. 7 приведен пример описания бесконечного роста с помощью уравнения (1).

Уравнение (1) можно назвать обобщенным уравнением роста, поскольку с его помощью описывается кинетика любого типа роста, наблюдаемого у животных. Тип роста определяется в основном величиной коэффициента c : если $c > 1$, то зависимость $Z(t)$ будет экспоненциальной; если $c = 1$ – линейной; если $0 < c < 1$ – асимптотической.

Представляют интерес также некоторые частные случаи. Так, если $V_0 = 0$ или $c = 0$, параметр Z остается постоянным, то есть изменения размеров тела не происходит. График зависимости $Z_{t+m}(Z_t)$ представлен точкой с координатами $(Z_0; Z_0)$.

Если $V_0 < 0$, то параметр роста постоянно уменьшается.

Таким образом, периоды уменьшения размеров животных также могут быть описаны уравнениями (1) и (2).

Особый интерес представляет вариант уравнения (1) с отрицательным коэффициентом c .

Дифференциальные уравнения с такими параметрами содержат волновую составляющую, связанную с появлением мнимой части в значении степенного коэффициента уравнений $k_g = -\ln(c)$.

Учет биоритмов позволяет более полно описывать процесс роста. Пример такого описания приведен на рис. 8.

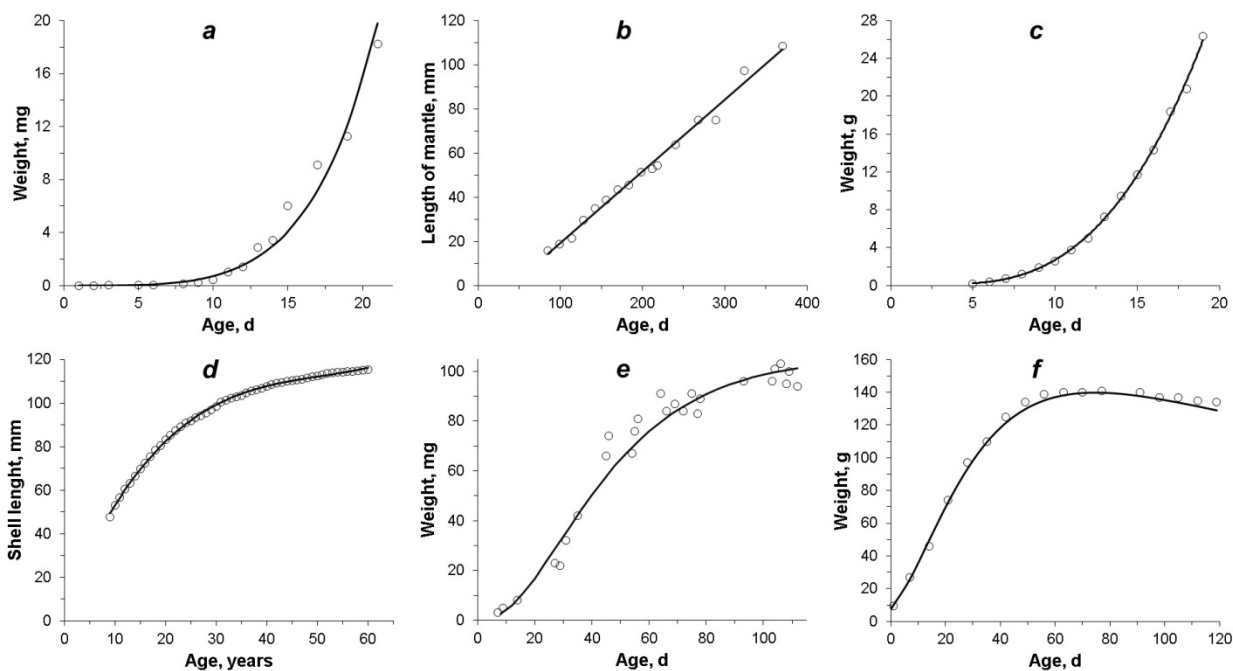


Рис. 7. Примеры описания роста уравнением (6). Кружки – экспериментальные данные, кривые – графики уравнения (6): *a* – экспоненциальный тип роста; *Leptestheria dahalacensis* (Branchiopoda), личинки и ювенилы; *b* – линейный тип роста; *Octopus bimaculoides* (Cephalopoda), взрослые; *c* – параболический тип роста; *Gallus gallus* (Aves), зародыши; *d* – замедляющийся асимптотический тип роста; *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia), взрослые; *e* – S-образный асимптотический тип роста; *Blatella germanica* (Insecta), имаго; *f* – S-образный конечный тип роста; *Coturnix coturnix* (Aves); взрослые.

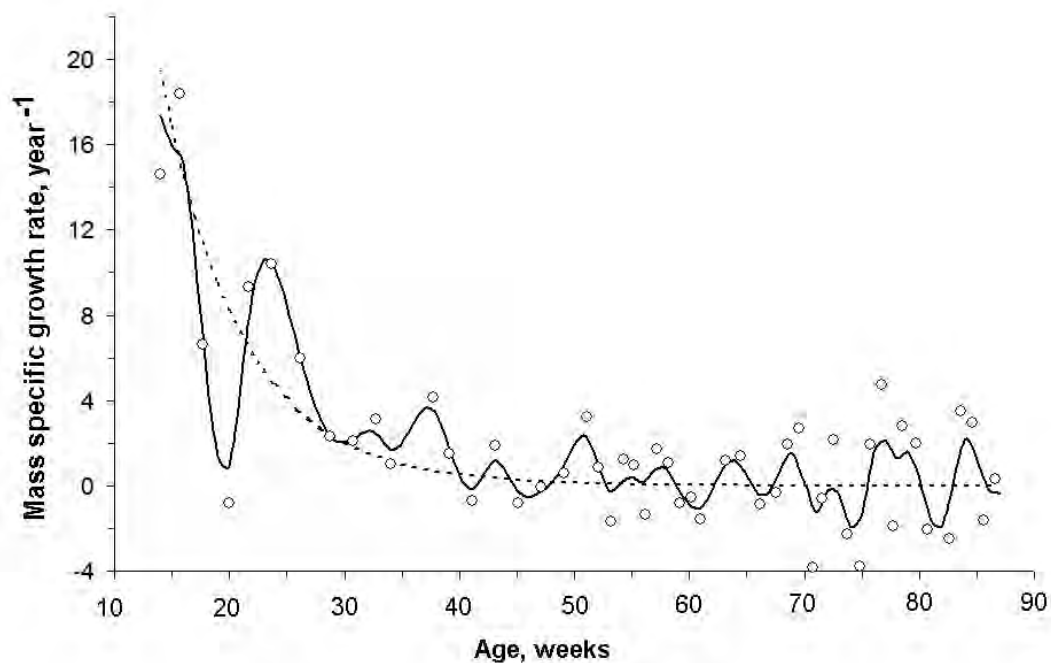


Рис. 8. Зависимость удельной скорости роста от возраста у *L. stagnalis* (Gastropoda). Кружки – экспериментальные данные, пунктирная кривая – описание основного тренда уравнением (6) при положительном значении коэффициента *c*. Сплошная кривая – сумма основного тренда и волновых составляющих, определяемых отрицательным значением коэффициента *c*.

Коэффициенты уравнения имеют довольно четкую биологическую трактовку. V_0 определяет первоначальную скорость процесса, c – изменение этой скорости, b – влияние на рост морфогенетических процессов, v – скорость самопроизвольного распада организма.

Небольшое количество коэффициентов позволяет легко аппроксимировать экспериментальные данные уравнением (1), а наличие линейной формы (2) – проводить сравнительный внутрипопуляционный, межпопуляционный и межвидовой анализ роста организмов.

9. Гипотеза о применимости уравнений линейной термодинамики к живым системам.

Проведено теоретическое обоснование применимости законов линейной термодинамики к живым системам. Предполагается, что в живых системах существует иерархия стационарных состояний, каждое из которых не стабильно и существует только в определенных рамках времени. Скорость эволюции системы к каждому из стационарных состояний не должна быть слишком быстрой, особенно, если учесть, что живые системы являются результатом длительной биологической эволюции. Вполне вероятно, что разница между текущей скоростью производства энтропии и скоростью производства энтропии в ближайшем стационарном состоянии достаточно мала, чтобы удовлетворить законам линейной термодинамики. Экспериментальные данные подтверждают эту гипотезу.

1.2. ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: денатурация, агрегация, мутагенез, ферменты, термолабильность.

Сокращения и обозначения:

HU белки - HU гистоноподобный белок, служит фактором в стимулировании многих взаимодействий **белок-ДНК**

БСА - бычий сывороточный альбумин

ДСК - дифференциальная сканирующая калориметрия.

DLS - метод динамического светорассеяния

Lys35 и Asn92 – аминокислота лизин в 35 позиции и аминокислота аспарагин в 92 позиции.

Phe14, Phe39, Phe31 - аминокислота фенилаланин в 14, 39 и 31 позициях белковой молекулы

ВВЕДЕНИЕ

Термостабильность гомологичных белков, изменяющаяся на разных стадиях индивидуального развития, при адаптациях к разным температурам среды, а также у обитателей различных широт, имеет общие молекулярные механизмы, которые определяются в первую очередь структурой белков. Механизмы, определяющие термостабильность белков, исследуются на моделях, связанных с изменением экспериментальным изменением первичной структуры белков и анализом последствий этих изменений. Вопросы термостабильности белков изучались нами на модельных объектах: гистоноподобных HU-белках микроорганизмов, формиатдегидрогеназе из разных источников, а также бычьим сывороточным альбумине как модели для анализа агрегации белков.

HU-белки играют важную роль в стабилизации генома бактерий и регуляции экспрессии генов, выполняя функции гистоновых белков эукариот. Стабильность структуры HU-белков в итоге означает надёжность функционирования генома и, в частности регуляции генной экспрессии. Изучение факторов обеспечивающих стабильность HU-белков имеет двойное значение. стабильность может применяться как для обеспечения надёжности роста культур микроорганизмов, так и для блокировки экспрессии генов, что может быть ещё одним способом предотвращения размножения болезнетворных микроорганизмов. Последнее имеет особенно важное значение в современных условиях, когда эффективность действия традиционных антибиотиков неуклонно снижается.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мутантные белки и белки с исходной аминокислотной последовательностью экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS (Alekseeva et al 2012a).

Очистку ферментов с аминокислотными заменами и исходной последовательностью проводили по описанной ранее методике очистки рекомбинантной SoyFDH (Alekseeva et al., 2012a). Концентрацию активных сайтов определяли как описано Е.Г. Романовой с соавторами (Romanova et al 2010) при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse Varian с длиной волны возбуждения 300 нм и излучения 350 нм соответственно. Для дифференциальной сканирующей калориметрии использовали адиабатический сканирующий микрокалориметр ДАСМ4М (НПО «Биоприбор» Пущино-на-Оке) с платиновыми ячейками объёмом 470 мкл (Sadykhov et al., 2006a,b; Alekseeva et al., 2012a,b).

Экспрессию, очистку, кристаллизацию и рентгеноструктурный анализ проводили описанными ранее методами (Boyko et al, 2015). Данные о структуре белка внесены в RCSB Protein Data Bank (код 4N1V) (Boyko et al, 2015).

Обработку диффракционной картины проводили при помощи программы iMosflm (Battye et al, 2011) с разрешением 1.4 Å. Для вычисления структуры белка использовали программу MOLREP (Vagin, A. & Teplyaev, 2010). Окончательную обработку структуры проводили с помощью программного пакета CCP4 (Winn et al, 2011). Визуальный контроль карты электронной плотности и ручную сборку модели выполняли при помощи программы COOT (Emsley et al, 2010).

Использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) производства Sigma-Aldrich BSA (кат. № А7638, 99% чистоты) без дополнительной очистки. Концентрацию БСА определяли спектрофотометрически при 280 nm используя коэффициент экстинкции $A = 6.58$ (Gill & Hoppel, 1989)[39].

Распределение агрегатов по размеру определяли при помощи Photocor Complex (Photocor Instruments, Inc., USA) в комплекте с He—Ne лазером (Coherent, USA, Model 31–2082, 632.8 nm, 10 mW) в качестве источника света. Для полидисперсного анализа данных DLS применяли DynaLS software (Alango, Israel).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методами сканирующей калориметрии, кругового дихроизма и сайт-направленного мутагенеза было показано, что мутации, приводящие к определенным аминокислотным заменам, существенным образом меняют структурные, термодинамические и каталитические свойства гомологичных белков (гистоноподобных HU-белках, формиатдегидрогеназы), полученных из

разных источников. Эти результаты согласуются с изменением термостабильности белков в онтогенезе и при температурных адаптациях.

Проведенный комплексный структурный анализ HU-белка из бактерии *Spiroplasma melliferum* КСЗ параллельно с применением дифференциальной сканирующей калориметрии выявили ключевые структуры, ответственные за высокую термостабильность белка. Также выполнен рентгенструктурный анализ молекулы HU-белка с разрешением 1,4 Å. Обнаружена высокая термостабильность HU-белка из этого объекта, близкая к таковой у термофильных штаммов бактерий.

Установлено, что неконсервативные остатки Phe14 и Phe39 усиливают гидрофобное взаимодействие между субъединицами, полуконсервативный остаток Phe31 отвечает за отсутствие внутренней полости между димерами, а Lys35 и Asn92 участвуют в создании водородных связей между субъединицами. Укрепление связей субъединиц за счёт усиления гидрофобных взаимодействий и водородных связей способствует повышению термостабильности молекулы в целом.

На основе анализа каталитических свойств и термостабильности рекомбинантной формиатдегидрогеназы сои было высказано предположение об особо важной роли аминокислоты в позиции 290. Сайт-направленный мутагенез фенилаланина Phe290 подтвердил высказанные предположения.

Полученные ранее три мутанта SoyFDH с повышенной термостабильностью по отношению к молекуле с исходной структурой показали повышение величины константы Михаэлиса (K_m) и как результат каталитической активности в 2-3 раза. В этой работе мы получили пять новых мутантных форм с изменением аминокислоты в 290 позиции. Вновь полученные мутантные формы ФДГ характеризуются повышенной термостабильностью по отношению к исходной форме. Тем не менее, в четырёх случаях K_m как для NAD^+ так и для формиата не увеличивалась и даже снижалась в некоторых случаях. В тех случаях, когда K_m возрастала, она возрастала для обоих субстратов. Полученные результаты для новых мутантных форм ФДГ оказались наивысшими среди всех исследованных форм. Таким образом, было установлено, что одна позиция аминокислоты в полипептидной цепи может одновременно изменять каталитическую активность и термостабильность фермента.

Исследования кинетики агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) обнаружили две фазы этого процесса. Методами DLS, аналитического ультрацентрифугирования, кругового дихроизма и сканирующей калориметрии показано образование двух пулов агрегирующих молекул БСА. Одна из форм денатурированного белка характеризуется высокой скоростью образования агрегатов. Эта часть образует первичные агрегаты денатурированного белка при температуре близкой к температуре максимума скорости денатурации. Вторая фракция с низкой

скоростью агрегации взаимодействует с первичными агрегатами при более высокой температуре. За счёт этой фракции молекул в основном увеличивается диаметр уже имеющихся начальных агрегатов. При этом количество агрегированных частиц увеличивается незначительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задача может считаться решённой в отношении ФДГ, но не других ферментов. Применённый подход может быть распространён на другие белки. В целом метод после соответствующей доработки может быть применён к любым ферментам, в том числе и к применяемым в ферментных комплексах для промышленного производства.

Дальнейшее изучение кинетики агрегации, особенно с учётом двух фаз её развития, позволит уточнить механизмы и возможные методы воздействия с целью предотвращения образования крупных белковых агрегатов в клетках. Изучение механизмов агрегации имеет большое значение для медицины, поскольку многие болезни, в частности, такие как катаракта и болезнь Альцгеймера, связаны с образованием внутриклеточных белковых агрегатов.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ПО ТЕМЕ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S. Yu., Uporov I.V., Pometun E.V. and Tishkov, V.I. *Prot. Eng. Des. Sel.* 2012a. 25. 781–788.
2. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S. Yu., Uporov I.V., Pometun E.V. and Tishkov V.I. *Biochemistry (Moscow)* 2012b. 77. 1445–1458.
3. Battye T. G., Kontogiannis L., Johnson, O., Powell H. R., Leslie A. G. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2011. 67. 271–281.
4. Boyko K. et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from *Spiroplasma melliferum* KC3. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2015. 71. 24–27.
5. Gill S.C., von Hippel P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989. 182: 319–326. PMID: 2610349
6. Emsley P., Lohkamp, B., Scott W. G. & Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010. 66, 486–501.
7. Romanova E.G., Alekseeva A.A., Pometun E.V. and Tishkov V.I. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2010. 65, 127–130.
8. Sadykhov E.G., Serov A.E., Yasnyi I.E., Voinova N.S., Alexeeva A.A., Petrov A.S. and Tishkov V.I. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2006a. 47, 31–34. (Russian).
9. Sadykhov E., Serov A., Voinova N., Uglanova S., Petrov A., Alekseeva A., Kleimenov S., Popov

- V. and Tishkov V. Appl. Biochem. Microbiol., 2006b. 42, 236–240.
10. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010. 66. 22–25.
11. Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2011. 67. 235–242.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ (раздел 1)

1. Березкина Г.В., **Зотин А.А.** Различия в морфологии раковины самцов и самок речных живородок *Viviparus viviparus* (Gastropoda, Pectinibranchia, Viviparidae) // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 8. С. 875-881.
2. **Зотин А.А., Клейменов С.Ю.** Эндогенные биоритмы удельной скорости роста в индивидуальном развитии *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda) // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 1. С. 5-14.
3. **Зотин А.А., Клейменов С.Ю.** Эндогенные биоритмы интенсивности потребления кислорода в индивидуальном развитии *Lymnaea stagnalis* (Lymnaeidae, Gastropoda) // Изв. РАН. Сер. биол. 2013. № 6. С. 653-660.
4. **Исаева В.В., Озернюк Н.Д., Рожнов С.В.** Свидетельства эволюционных изменений онтогенеза: Палеонтологические, сравнительно-морфологические и молекулярные аспекты // Известия РАН. Серия биол. 2013. № 3. С. 273-283.
5. Makhrov A., Besspalaya Ju., Bolotov I., Vikhrev I., Gofarov M., Alekseeva Ya., **Zotin A.** Historical geography of pearl harvesting and current status of populations of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) in the western part of Northern European Russia // Hydrobiologia. 2013. DOI 10.1007/s10750-013-1546-1 (опубликовано онлайн 17.05.2013).
6. **Озернюк Н.Д.,** Мюге Н.С. Крупномасштабные дубликации генов и дивергенция паралогичных генов на примере рыб // Генетика. 2013. Т. 49. №1. С.73-80
7. *Stekhanova T. N, Bezsudnova E. Y., Mardanov A. V., Gumerov V. M., Artemova, N, Kleymenov S. Y., Popov V. O.* Sodium Chloride-Induced Modulation of the Activity and Thermal Stability of Short-Chain Oxidoreductase from the Archaeon *Thermococcus sibiricus* // Appl. Biocem. Biotechnol. 2013. V. 171. P. 1877-1889.
8. Цетлин В.В., **Зотин А.А.,** Мойса С.С. Влияние изменения магнитного поля на развитие роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Planorbidae) // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2014. Т. 48. № 3. С. 36-44.
9. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Roman S.G., **Kleymenov S.Yu.,** Makeeva V.F., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. Thermal Denaturation and Aggregation of Apoform of Glycogen

- Phosphorylase b. Effect of Crowding Agents and Chaperones. // Biopolymers. 2014. V. 101(5). P. 504-516.
10. **Zotin A.A.** Why linear thermodynamics does describe change of entropy production in living systems? // Natural Science. 2014. V. 6. P. 495-502. (<http://www.scirp.org/journal/NS/>)
 11. **Zotin A.A., Ozernyuk N.D.** Comparative study of aerial and aquatic respiration in periwinkles *Littorina* // News of Science and Education. 2014. V. 12. N 12. P. 34-43. (http://elibrary.ru/titles_compare.asp)
 12. **Zotin A.A., Kirik E.F.** Intravital identification of stages of normal development of the great ramshorn snail *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Planorbidae) // News of Science and Education. 2014.
 13. Алексеева А.А., Каргов И.С., **Клейменов С.Ю.**, Савин С.С., Тишков В.И. Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной формиатдегидрогеназы из сои *Glycinemax* // ActaNaturae. 2015. Т. 7(26). С. 61-71.
 14. Borzova V.A., Markossian K.A., Muranov K.O., Polyansky N.B., **Kleymenov S.Y.**, Kurganov B.I. Quantification of anti-aggregation activity of UV-irradiated α -crystallin // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 73. N 2. P. 84-91.
 15. Kargov I.S., **Kleymenov S.Y.**, Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva A.A. Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design // Protein Eng. Des. Sel. 2015. V. 28. N. 6. P. 171-178.
 16. Slutskaaya E., Artemova N., **Kleymenov S.**, Petrova T., Popov V. Heat-induced conformational changes of TET peptidase from crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* // EurBiophys J. 2015. V. 44(8). P.667-675.
 17. **Зотин А.А.** Особенности линейного роста *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae), влияющие на морфометрические параметры раковины // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 3. С. 285-292.
 18. **Zotin A.A.** The united equation of animal growth // Amer. J. Life Sci. 2015. V. 3. No 5. P. 345-351
 19. Moisa S.S., **Zotin A.A.**, Tsetlin V.V. The embryonic development of great ramshorn *Planorbarius corneus* under the hypomagnetic field // Amer. J. Life Sci. Special Issue: Space Flight Factors: From Cell to Body. 2015. V. 3. N. 1-2. P. 25-31.
 20. **Зотин А.А.**, Иешко Е.П. Неравномерность линейного роста *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae). Популяция реки Сюскюяньйоки, Карелия // Известия РАН. Сер.биол. 2016. № 1. С. 73-80. DOI: 10.7868/S0002332916010161

21. **Зотин А.А.**, Иешко Е.П. Неравномерность линейного роста *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae). Популяция реки Немина, Карелия // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 4. С. 422–429.
22. Borzova V.A, Markossian K.A, Chebotareva N.A, **Kleymenov S.Y**, Poliansky N.B, Muranov K.O, Stein-Margolina V.A, Shubin V.V, Markov D.I, Kurganov B.I. Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin // PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0153495 April 21, 2016
23. Boyko K, Rakitina T, Korzhenevskiy D, Vlaskina A, Agapova Y, Kamashev D, **Kleymenov S**, Popov V. Structural basis of high thermal stability of histone-like HU protein from mollicute *Spiroplasma melliferum* КС3. // Scientific Reports 2016 | 6:36366.
24. **Зотин А.А.**, Кирик Е.Ф. Индивидуальный рост зародышей роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Planorbidae) // Онтогенез. 2016. № 5. С. 296–306. DOI: 10.7868/S0475145016050104

Раздел 2. ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МЫШЦ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: гипоксия, соматическая мускулатура, куриный зародыш

Сокращения:

ДК — двигательный комплекс

ПП — период покоя

ПД — потенциал действия

2.1. Изучение возрастных особенностей влияния длительной гипоксии высокого уровня (5% кислорода) на двигательную активность куриного зародыша.

ВВЕДЕНИЕ

Продолжая исследования влияния гипоксии на эмбриональную моторику куриного зародыша в процессе развития, мы изучили влияние на подвижность зародыша уровня и длительности гипоксии. Куриный зародыш широко используется в качестве модельного объекта при исследовании пренатальной гипоксии. В настоящее время проводится поиск способов коррекции пренатальной гипоксии. Большое внимание уделяется изучению двигательной активности в эмбриогенезе, поскольку она существенно влияет на развитие опорно-двигательной системы, а также на формирование нервных связей [1-5].

Однако вопрос о том, каким образом изменения эмбриональной моторики, вызванные экспериментальной гипоксией, влияют на формирование моторного поведения, на развитие опорно-двигательной системы, а также, каков их вклад в адаптацию зародыша к внешним условиям, остаются не достаточно изученными. Поэтому наши исследования изменения эмбриональной моторики при острой гипоксии могут помочь в понимании формирования интегрального ответа эмбриона на гипоксию.

Исходя из этого, задачей наших исследований было изучение эффектов острой гипоксии (газовая смесь 5%O₂ и 95%N₂) длительностью 20 и 40 мин на двигательную активность куриного зародыша на разных стадиях развития во второй трети эмбриогенеза (10-15 сут инкубации).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Опыты проводили на курином зародыше. Яйца инкубировали при 37.5°C и относительной влажности 60%. Исследования проводили на 10, 12, 14 и 15 сут инкубации. Для регистрации соматической двигательной активности на этих стадиях развития яйцо помещали и термостатируемую экспериментальную камеру при 37.5°C с постоянным протоком подогретого

влажного воздуха со скоростью 200 мл/мин. В скорлупе над зародышем вырезали отверстие диаметром около 2 см. Датчик механотрона присоединяли к конечностям зародыша с помощью серфина, чтобы регистрировать соматические движения зародыша *in ovo* (Turpaev et al., 1990) и одновременно проводили видеорегистрацию с помощью цифровой видеокамеры Scopetek DCM-800 (Shangrao TeleView Optical Instruments Co., Ltd, China) закрепленной к микроскопу ОПТИКА SZM-2Led (Italy) (Рис.1.).

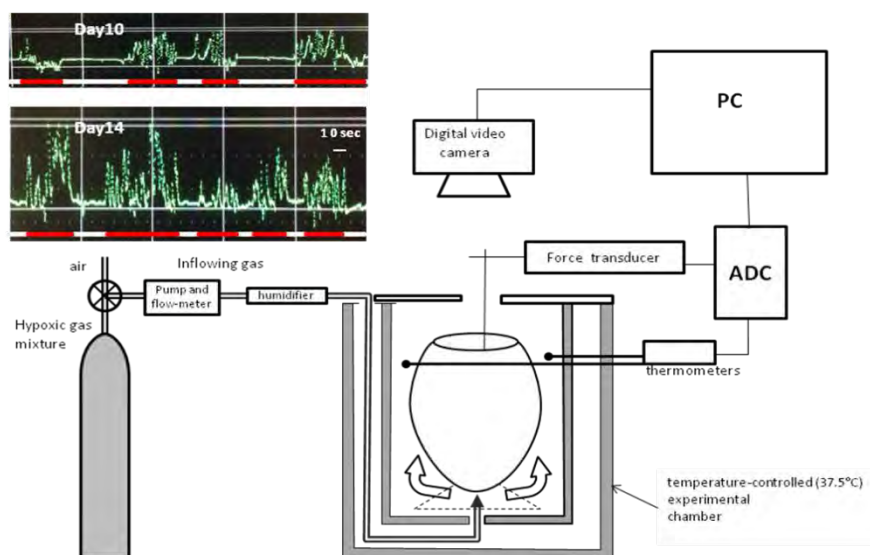


Рис.1. Схема установки (Nechaeva, Alexeeva 2016).

Регистрацию и анализ соматической двигательной активности зародыша проводили на компьютере. Среднее значение периода покоя и периода активности эмбриональной моторки определяли каждые 5 мин при непрерывном эксперименте. После манипуляций, связанных с подготовкой яйца к эксперименту, следовал период стабилизации 30 мин. Затем регистрировали двигательную активность зародыша в контроле (при аэрации воздухом) в течение 30 мин. Затем в течение 20 или 40 мин через экспериментальную камеру пропускали с такой же скоростью газовую смесь, содержащую 5% O₂ и 95% N₂. После этого газовую смесь была заменена на воздух, и проводили регистрацию в течение 30 мин. Данные представлены в виде средних значений с указанием стандартной ошибки измерения. Полученные результаты проанализированы с помощью программы «Statistica (version 7.0, Statsoft). STATISTICA 6.0». Непараметрический Wilcoxon test использовали чтобы оценить эффект гипоксии и восстановление в воздухе. Различия считали значимыми, если $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эмбриональная двигательная активность имеет циклический характер на всех исследованных стадиях эмбрионального развития, и состоит из периодов двигательной активности – двигательных комплексов (ДК) и периодов покоя (ПП) (см. Рис. 1). Наши результаты показали выраженную зависимость ответа циклической моторики зародыша на гипоксию длительностью 20 мин от возраста в период 10-15 сут инкубации (Рис. 2). Во всех случаях циклическая моторика снижалась по сравнению с нормоксией (control).

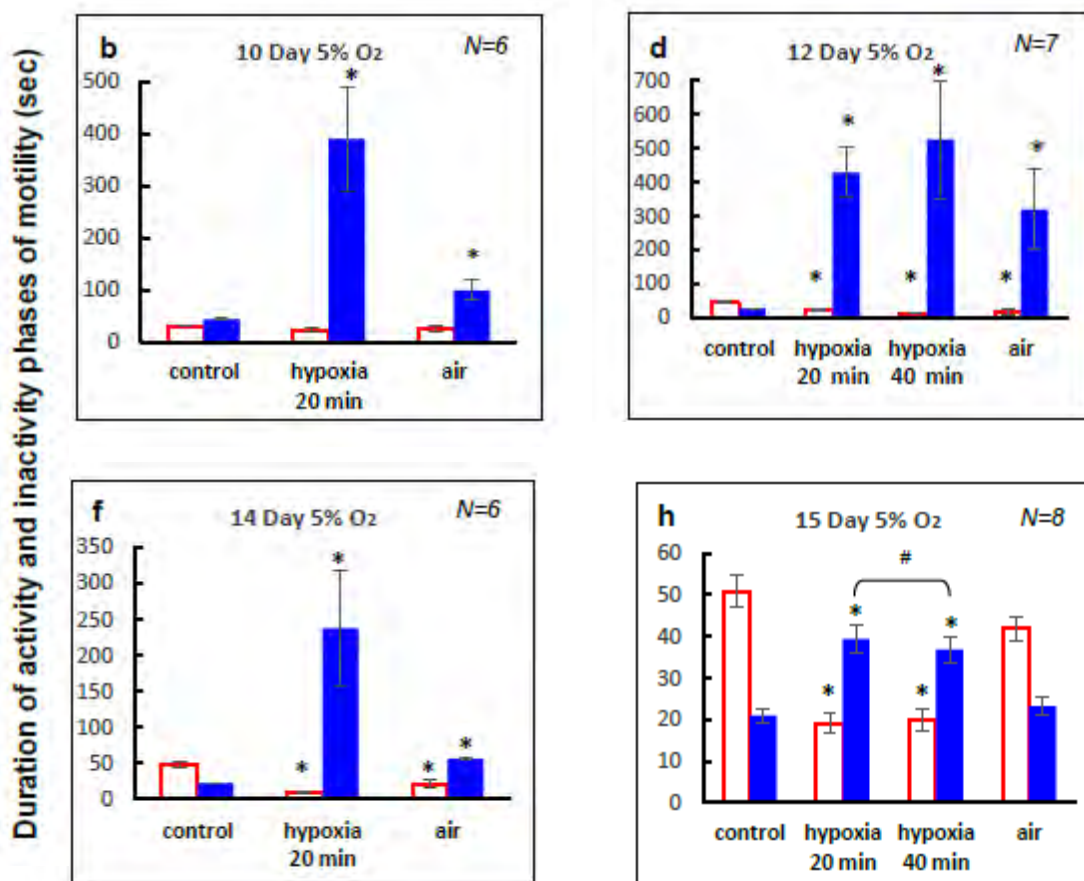


Рис.2. Эффект острой гипоксии (5% O₂) в течение 20 или 40 мин на длительность активной фазы (открытые столбики) и неактивной фазы (закрашенные столбики) эмбриональной моторики и восстановление в воздухе в течение 30 мин после гипоксии на 10 сут (b), 12 сут (d), 14сут (f) и 15 сут (h) инкубации. Данные представлены как среднее за 20 мин до гипоксии, 20 или 40 мин при гипоксии и за 30 мин во время восстановления в воздухе. Результаты представлены как means ± S.E.M. N указывает число исследованных эмбрионов. (*) – достоверное различие от контроля при нормоксии (control) ($P < 0.05$; Wilcoxon test); (#) – достоверное различие между величинами при 20 и 40 мин гипоксии ($P < 0.05$; Wilcoxon test). (Nechaeva, Alexeeva, 2016)

Важным результатом наших исследований являются данные о динамике параметров циклической моторики во время гипоксии с периодом 5 мин (Рис.3). Мы обнаружили, что динамика моторики при гипоксии зависит не только от возраста зародыша, но и от длительности

гипоксии. Анализ изменения параметров циклической моторики (длительность ПП и ДК) на разных стадиях развития показало, что зародыш начинает проявлять возможность поддерживать моторику в периоде 10-15 сут инкубации. Данная способность увеличивается с возрастом, и мы полагаем, что это связано с формированием регуляторных механизмов. Результаты экспериментов с 5% гипоксией демонстрирует высокий уровень созревания регуляторных механизмов к 15 сут. инкубации (моторика зародыша частично восстанавливается на фоне гипоксии) в отличие от ранних возрастов, когда гипоксия быстро прекращает движения зародыша (Рис.3).

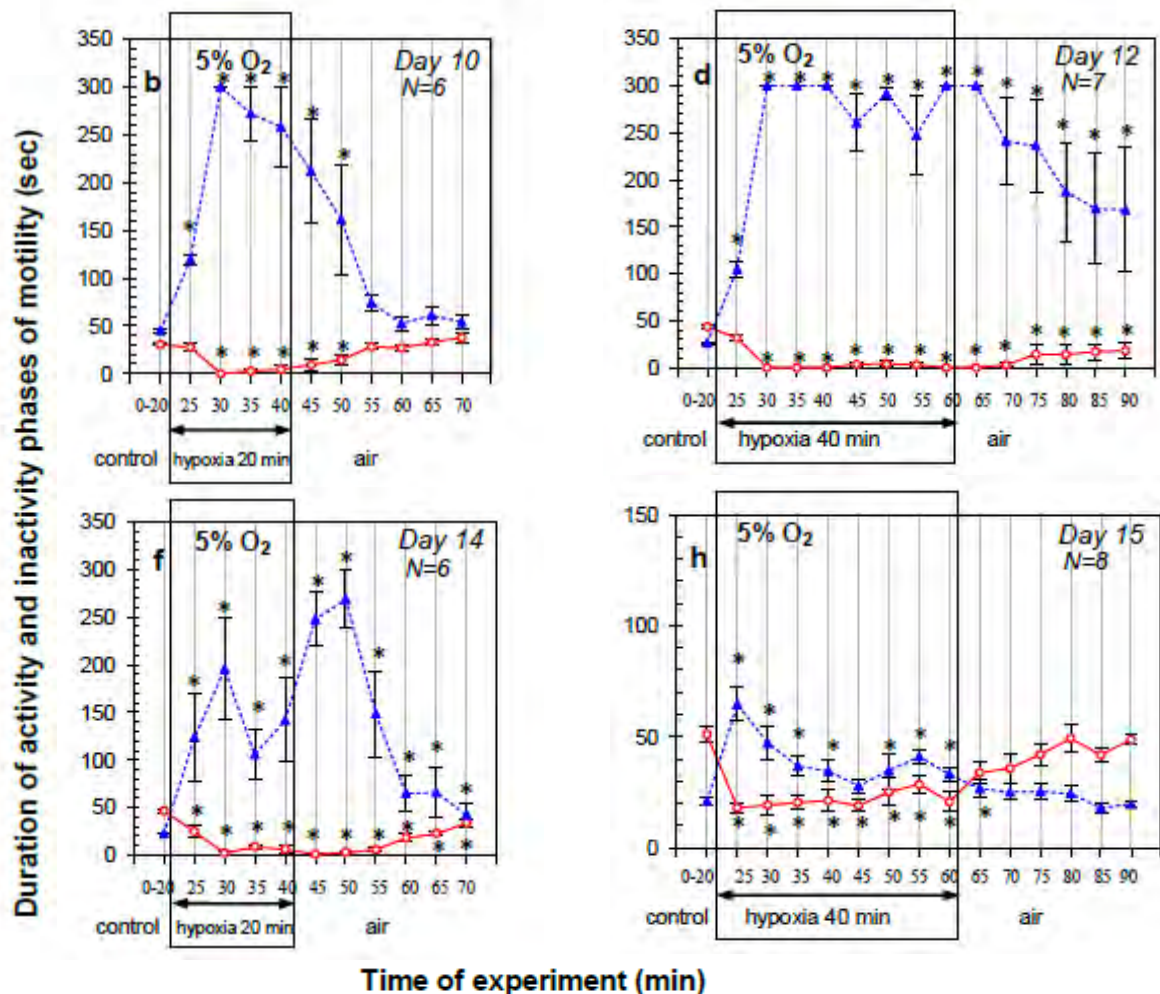


Рис.3. Динамика изменения активной фазы (пустые кружки) и неактивной фазы (закрашенный треугольник) циклической моторики куриного зародыша во время гипоксии (5%O₂) 20 мин или 40 мин и во время 30 мин восстановления после гипоксии на 10 сут (b), 12 сут (d), 14сут (f) и 15 сут (h) инкубации. Величины представлены как means ± 1 S.E.M. N указывает число исследованных эмбрионов. (*) - достоверность различий от контроля ($P < 0.05$; Wilcoxon test). Контроль (control) определялось как среднее за 20 мин до гипоксии и указано на графиках как 0-20. Во время гипоксии и восстановлении в воздухе данные представлены как среднее за каждые 5 мин. (Nechaeva, Alexeeva, 2016)

2.2. Исследование сократительной активности изолированных мышц куриного зародыша при острой гипоксии.

ВВЕДЕНИЕ

Оценивая суммарную двигательную активность зародыша в яйце, мы показали ее изменение при гипоксии во второй трети периода эмбриогенеза куриного зародыша, и в тоже время не вызывает сомнения, что двигательная активность зародыша в значительной степени зависит от сократительных характеристик скелетных мышц. Однако, вопрос о том, как изменяются эти характеристики при гипоксии, остается не изученным. Задачей данного исследования было: 1) описать эффект острой гипоксии на сократительные и электрические ответы быстрых и медленных изолированных скелетных мышц куриного зародыша в последней трети эмбриогенеза и оценить их возрастные изменения (16-20 сутки инкубации); 2) для анализа механизмов изменения сократительных ответов эмбриональных мышц при острой гипоксии, исследовать влияние на них инсулина и оуабаина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на изолированных медленных (*m. soleus*) и быстрых (*m. tibialis anterior*) мышцах куриного зародыша в последней трети эмбриогенеза (16-20 сутки инкубации) с использованием механографического и микроэлектродного методов исследования (loose patch). Были исследованы амплитудно-временные характеристики одиночных и тетанических ответов мышц, а также внеклеточные потенциалы действия (ПД) одиночных мышечных волокон в процессе эмбрионального развития и при уменьшении концентрации кислорода в растворе.

Изолированная мышца помещалась в термостатируемую экспериментальную камеру объемом 20 мл, заполненную раствором Хенкса аэрируемым карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂). Температура раствора поддерживалась на уровне +25°C. Одиночные, тетанические и контрактурные сокращения исследуемых мышц регистрировались в изометрическом режиме с помощью тензорезистора КТД 7Б, соединенного с входом усилителя. Одиночные и тетанические сократительные ответы вызывали прямым раздражением мышцы через пару хлорированных пластинчатых серебряных электродов, фиксированных на внутренних боковых поверхностях стенок камеры, стимулами сверхпороговой силы длительностью 10 мс, формируемыми электронным стимулятором ЭС-50-1. Для минимизации различий исходной силы сократительных ответов исследуемых мышц, которые связаны с существенным варьированием их веса, в зависимости от сроков развития эмбрионов, абсолютные значения регистрируемых ответов были нормализованы по отношению к весу мышцы (мН/мг).

Уменьшение содержания кислорода достигалось путем замены аэрируемого раствора на неаэрируемый. Уровень кислорода в растворе контролировался с использованием оксиметра АТЕ-30012 и составлял, в среднем, 22 мг/л в аэрируемом и 7 мг/л в неаэрируемом растворах. После

препаровки мышца помещалась в экспериментальную камеру с аэрируемым раствором Хенкса, где стабилизировалась в течение 30 мин. Затем регистрировали сокращения мышцы или внеклеточные ПД (контроль). После этого осуществляли замену аэрируемого раствора на неаэрируемый и через 30 минут проводили повторную регистрацию ответов. Далее осуществлялась 30-минутная реоксигенация раствора и регистрация ответов.

Внеклеточную регистрацию ПД одиночных мышечных волокон потенциалов (loose patch) в составе изолированных *m. tibialis anterior* и *m. soleus* куриных эмбрионов проводили в соответствии с ранее описанными методами [6,7]. Запись данных, хранение и обработка производилась при помощи аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 (National Instruments) и программного пакета Clampfit и Origin 7.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании механографических и микроэлектродных исследований на медленных (*m. soleus*) и быстрых (*m. tibialis anterior*) мышцах во второй половине эмбриогенеза куриного зародыша (17-20 сутки инкубации) было показано, что в эмбриональной моторике куриного зародыша в данный период преимущественно участвуют мышцы быстрого типа. При этом механографическая регистрация демонстрирует существование медленных перистальтических волн, следующих за одиночными, и особенно, за тетаническими ответами, являющихся следствием синхронизации электрических осцилляций (Рис. 4).

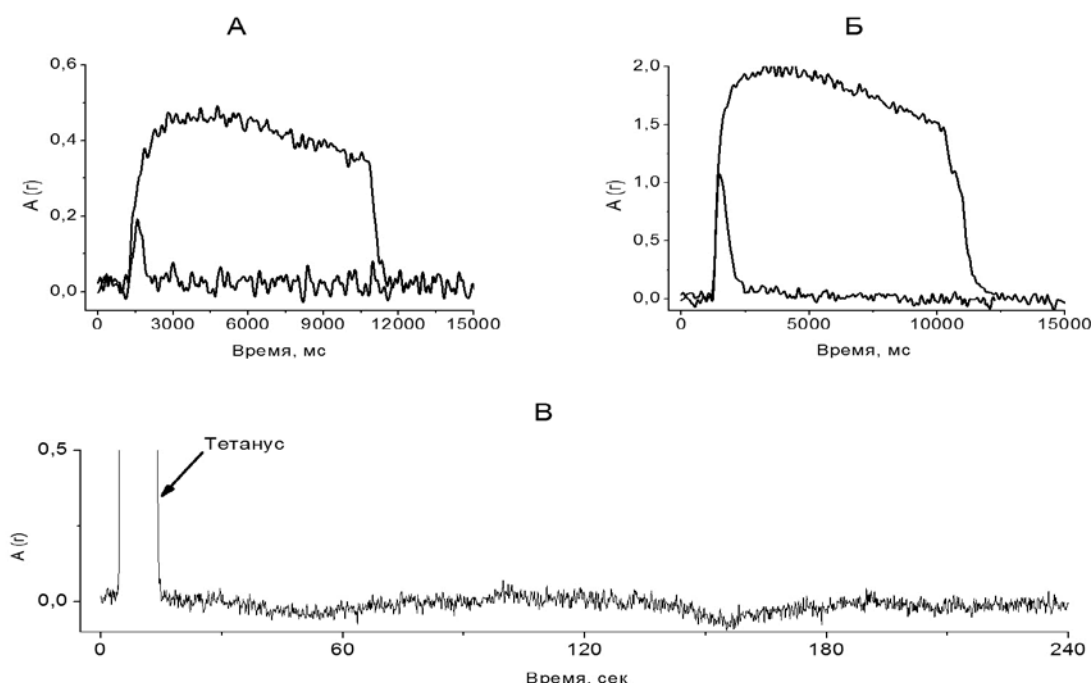


Рис. 4. А, Б - суперпозиция одиночных и тетанических (50 стимулов, 20 Гц) сократительных ответов *m. soleus* (А) и *m. tibialis anterior* (Б) куриных зародышей (18 сутки инкубации). В – сократительные осцилляторные волны в *m. tibialis anterior* 18-ти суточного куриного зародыша в ответ на тетаническую стимуляции (50 стимулов, 20 Гц). (Кубасов, Нечаева, Алексеева, 2014)

Природа такой осцилляторной компоненты остается неясной и требует проведения отдельных дополнительных исследований, однако эта находка дает основание полагать, что на более ранних стадиях эмбриогенеза такой вид электрогенной активности составляет основу эмбриональной моторики.

В серии экспериментов с использованием внеклеточных микроэлектродов (loose patch) было показано, что одновременно с увеличением числа активных мышечных волокон, способных формировать полноценные ПД, в процессе инкубации существенно менялись временные характеристики генерируемых ответов. Как видно из примеров записей рис. 5, внеклеточно регистрируемые ПД мышечных волокон представляли собой преимущественно двухфазные ответы, появляющиеся в соответствии с законом «все или ничего». Вторая фаза этих ответов проявляла отчетливую тенденцию к укорочению длительности спада с увеличением возраста зародыша и появление 3-й позитивной фазы ПД. Достоверных различий между амплитудно-временными характеристиками ПД мышечных волокон *m. soleus* и *m. tibialis anterior* выявлено не было.

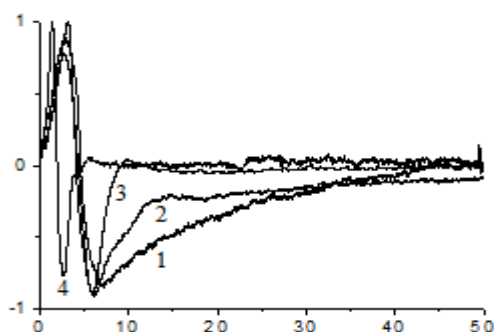


Рис.5. Примеры записей ПД (нормализованные значения) одиночных мышечных волокон *m. tibialis anterior* куриного эмбриона на 18 (1), 19 (2) и 20 (3) сутки инкубации и на первые сутки после вылупления (4). По оси абсцисс – время (мс), по оси ординат - амплитуда (мВ). (Кубасов, Нечаева, Алексеева, 2014)

Гипоксия вызывала снижение силы сократительных ответов мышц на всех исследованных сроках инкубационного периода эмбрионов (Рис. 6). На фоне гипоксии почти вдвое снижался показатель m/M , характеризующий соотношение числа волокон, способных генерировать ПД (m), к общему числу протестированных волокон (M) в соответствии с законом «все или ничего».

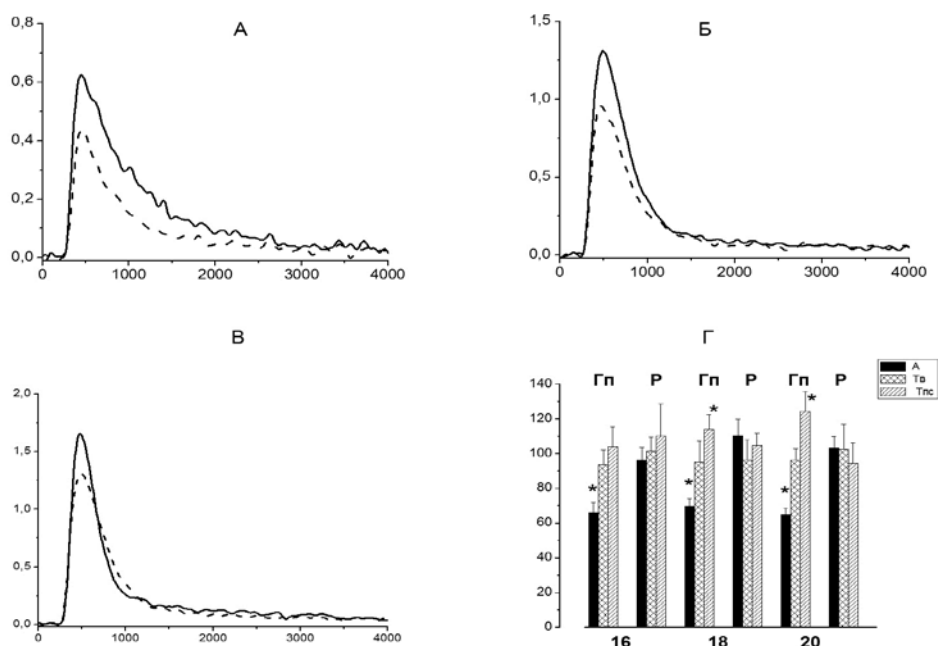


Рис. 6. Влияние гипоксии на одиночные сократительные ответы *m. tibialis anterior* 16-ти (А), 18-ти (Б) и 20-ти (В) суточных эмбрионов. Сплошная линия – контроль, прерывистая – 30-я минута гипоксии. По вертикальной оси – сила сокращения (г), по горизонтальной оси – время (мс). Г – Изменения амплитудно-временных характеристик одиночных сократительных ответов *m. tibialis anterior* куриного эмбриона при гипоксии и реоксигенации (% к контролю). Гп – гипоксия, Р – реоксигенация. Звездочками отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольных ($p < 0.05$). (Кубасов, Нечаева, Алексеева, 2014)

Было показано, что чувствительность сократительных ответов к действию гипоксии у изолированных мышц (*m. tibialis anterior*) куриного зародыша существенно снижалась после обработки инсулином и оубаином (Рис. 7). Из данных следует, что в эффектах гипоксического воздействия на эмбриональные мышцы активное участие принимает мембранная Na^+/K^+ -АТФаза.

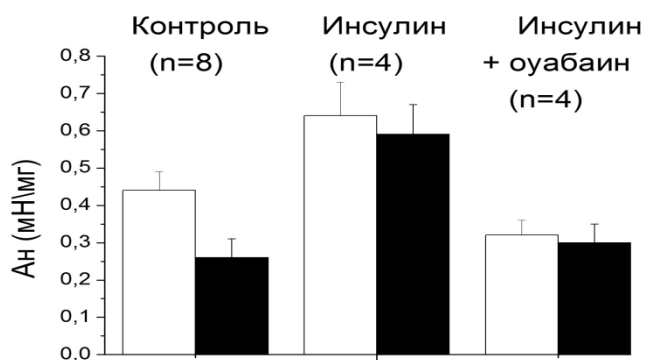


Рис. 7. Влияние гипоксии на силу сократительных ответов *m. tibialis anterior* куриного зародыша (18 суток инкубации) в контроле, на фоне инсулина и при совместном действии инсулина и оубаина. Белые столбики – аэрируемый раствор, черные столбики – гипоксический раствор. (Кубасов, Нечаева, Алексеева, 2014)

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ

- [1] Hogg DA, Hosseini A. The effects of paralysis on skeletal development in the chick embryo. *Comp Biochem Physiol A* 1992; 103: 25-8.
- [2] Oppenheim RW, Prevette D, Houenou LJ, *et al* . Neuromuscular development in the avian paralytic mutant crooked neck dwarf (cn/cn): further evidence for the role of neuromuscular activity in motoneuron survival. *J. Comp. Neurol* 1997; 381: 353-72.
- [3] Hanson MG, Landmesser LT. Normal patterns of spontaneous activity are required for correct motor axon guidance and the expression of specific guidance molecules. *Neuron* 2004; 43: 687-701.
- [4] Heywood JL, McEntee GM, Stickland NC. In ovo neuromuscular stimulation alters the skeletal muscle phenotype of the chick. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; 26: 49-56.
- [5] Pitsillides AA. Early effects of embryonic movement: 'a shot out of the dark'. *J Anat* 2006; 208: 417-31.
- [6] Wolters H., Wallinga W., Ypey D.L., Boom H.B.K. Ionic current during action potential in mammalian skeletal muscle fibers analyzed with loose patch clamp. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 267 : 1699-1706. 1994.
- [7] Kubasov I.V., Dobretsov M. Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. *J. Physiol.* 590 : 937-944. 2012.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ (раздел 2)

1. Кубасов И.В., **Нечаева М.В., Алексеева Т.А.** Влияние гипоксии на сократительные и электрические ответы скелетных мышц куриного зародыша в последней трети эмбриогенеза. // *Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова.* 2014. Т.100. N2. С. 187-200.
2. Kubasov I.V., **Nechaeva M.V., Alekseeva T.A.** Effects of Hypoxia on the Contractile and Electrical Responses of Chick Embryo Skeletal Muscles in the Last Third of Embryogenesis // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2015. V. 45. No. 8. P. 894-901.
3. **Nechaeva M.V., Alekseeva T.A.** Age-related Changes in the Response of Embryonic Motility to Acute Hypoxia during the Third Quarter of Chick Embryogenesis. *Open Ornithology Journal*, 2016, 9, DOI: 10.2174/187445320160901.

Раздел 3. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА В НОРМЕ И ПРИ НАРУШЕНИЯХ ГОМЕОСТАЗА

Раздел 3.1. Кальциевая сигнализация в мышечной ткани.

ВВЕДЕНИЕ

Кальциевые каналы L-типа относятся к наиболее изученным потенциалзависимым ионным каналам. Поступление Ca^{2+} как вторичного мессенджера через каналы Cav1.3 играет ключевую роль в регуляции различных внутриклеточных процессов.

В соответствии с многофункциональностью каналов Cav1.3 существуют различные пути их активации и деактивации. Протеинкиназа А способна активировать эти каналы, инициируя вход Ca^{2+} (Seino et al., 1992; Qu et al., 2005; Mahapatra et al., 2012). Фосфорилирование другими киназами (протеинкиназы G и C), наоборот, ингибирует кальциевый ток по этим каналам (McHugh et al., 2000; Baroudi et al., 2006; Chahine et al., 2008; Mahapatra et al., 2012). Сведения о физиологических особенностях мышечных клеток на начальных этапах дифференцировки, приводимые в литературе, получены главным образом при исследовании первичных культур сателлитных клеток и линий миобластов (Kislinger et al., 2005).

Цель данной работы – изучение сателлитных клеток, локализованных на единичных изолированных мышечных волокнах для установления наличия каналов Cav1.3 и их связи с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами, а также изучение некоторых особенностей кальциевого метаболизма сателлитных клеток на стадии пролиферативного покоя в более характерном для них микроокружении (на мышечных волокнах) по сравнению с клеточными культурами

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были мышечные волокна, изолированные из мышц задней конечности (*m. flexor digitorum brevis* – короткий сгибатель пальцев) крысы в возрасте 8–12 недель методом энзиматического расщепления с помощью коллагеназы I, и диспазы. Мышечные волокна культивировались на полистирольном пластике.

Выделение мышечных волокон. Короткий сгибатель пальцев получали хирургическим путем из задних конечностей крысы. Целая мышца инкубировалась 1.5–2 ч в растворе, приготовленном на среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ПанЭко, Россия) и содержащем по 0.2% коллагеназы I (ПанЭко) и диспазы (SigmaAldrich, США). После ферментативной обработки диссоциацию волокон проводили перемешиванием с помощью пастеровской пипетки. Для прикрепления выделенных волокон к дну планшета их оставляли в инкубаторе на 30–40 мин при 37°C. Затем волокна либо фиксировались для

иммуноцитохимических исследований, либо инкубировались в растворе кальциевого красителя Fluo 3 (Invitrogen, США). Весь процесс выделения и подготовки волокон для последующего анализа занимал менее 3 ч.

Для характеристики метаболизма Ca^{2+} в сателлитных клетках их инкубировали 10–15 мин при 37°C с 10 мкМ растворами селективных ингибиторов каналов L

Для характеристики метаболизма Ca^{2+} в сателлитных клетках их инкубировали 10–15 мин при 37°C с 10 мкМ раствора селективных ингибиторов каналов L-типа (верапамиллом и амлодипином), а также с 0.1 мкМ раствором ингибитора β_2 адренорецепторов ICI 118551 (Sigma Aldrich). В качестве первичных мессенджеров использовались 0.1–1 мМ растворы карбахола (Sigma Aldrich), 10 мкМ адреналина (Sigma Aldrich) и 1 мкМ норадреналина (Sigma Aldrich). Все агенты для каждого эксперимента готовились заново. Для экспериментов в бескальциевой среде первоначальный раствор Хэнкса (с кальцием) заменялся на бескальциевый (Invitrogen). Каждый эксперимент был повторен не менее 10 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение препаратов изолированных мышечных волокон с помощью конфокального микроскопа показало, что на их поверхности расположены четко идентифицируемые клетки (рис. 1а, б, д, е), а иммуноцитохимическое исследование доказало, что они являются сателлитными – в них отчетливо видно окрашивание антителами против транскрипционного фактора Pax7 и белка клеточной адгезии М-кадгерина, маркеров сателлитных клеток скелетных мышц. Кроме того, окраска антителами против белков канала Cav1.3 доказывает их присутствие в сателлитных клетках. Было отмечено, что все сателлитные клетки, окрашивавшиеся Pax7 и М-кадгерином, также окрашивались антителами против $\alpha 1D$ субъединицы каналов Cav1.3 (рис. 1в, г, ж, з).

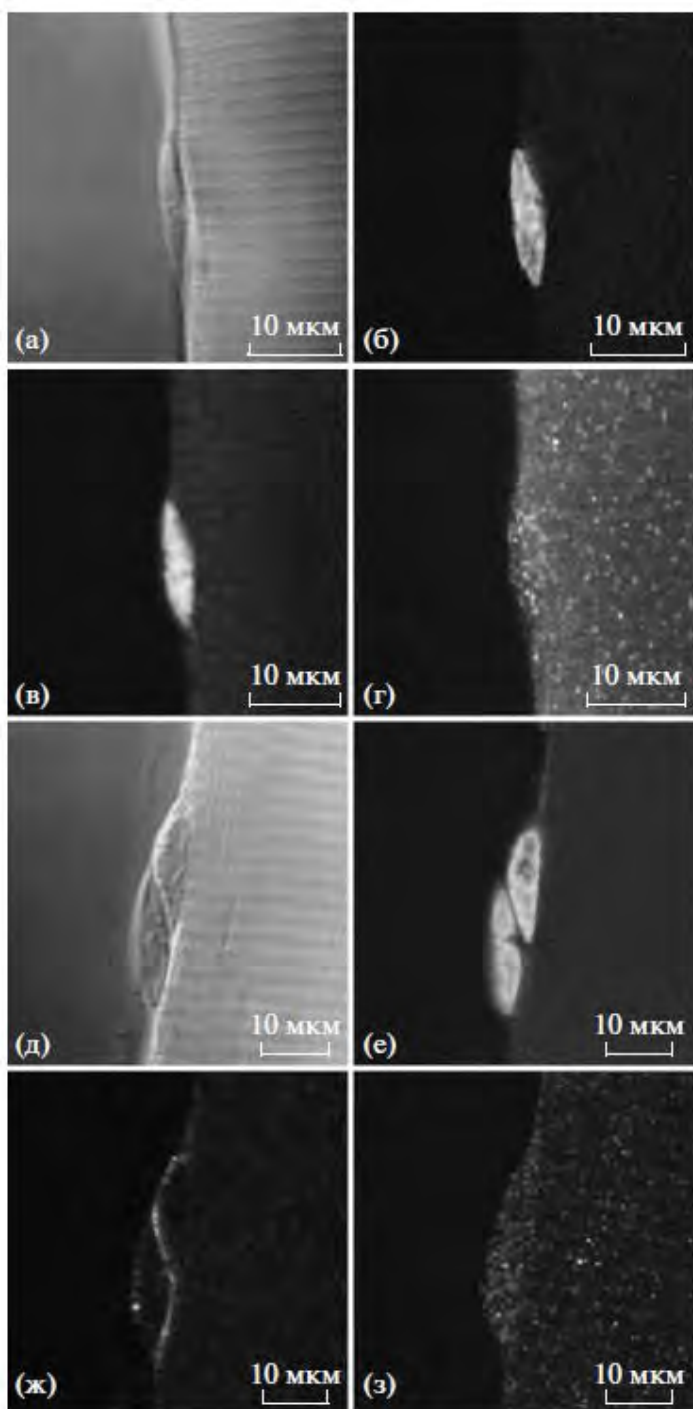


Рис. 1. Сателлитные клетки на единичных мышечных волокнах. Проходящий свет (а, д); окраска ядерным красителем Hoechst 33342 (б, е); иммуноцитохимическое выявление: транскрипционного фактора Pax7 (в), белка клеточной адгезии М-кадгерина (ж), субъединицы $\alpha 1D$ кальциевого канала $Ca_v1.3$ (г, з). Конфокальная микроскопия.

Было показано также, что добавление карбахола в среду индуцирует поступление Ca^{2+} в сателлитные клетки и в подлежащее мышечное волокно в зоне их контакта, что следует из повышения интенсивности сигнала флуоресценции от цитоплазмы клеток, нагруженных красителем Fluo 3 (рис. 2а, б).

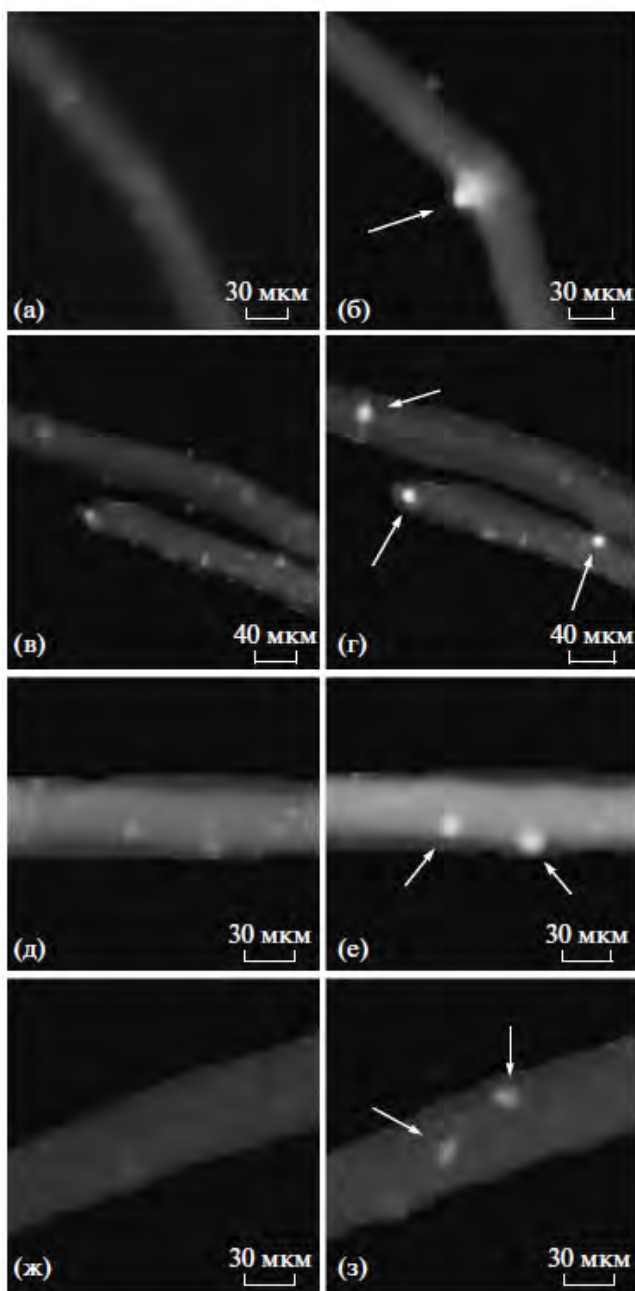


Рис. 2. Мышечные волокна с сателлитными клетками, окрашенные красителем Fluo-3, до добавления (контроль) карбахола (а), адреналина (в, д), адреналина в бескальциевой среде (ж) и после добавления карбахола (б) (стрелка – зона максимального входа кальция в сателлитную клетку и волокно), адреналина (г), адреналина с предварительным ингибированием кальциевых каналов верапамилом (е), адреналина в бескальциевой среде (з). Стрелки (г, е, з) – повышенные интенсивности сигнала красителя от сателлитных клеток, лежащих на волокне.

Сателлитные клетки, успевшие прикрепиться к пластиковой подложке, реагируют на добавление карбахола подобным образом. В бескальциевой среде сигнал от мышечных волокон при добавлении карбахола значительно увеличивался. В сателлитных клетках цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} оставалась на постоянном уровне до и после добавления карбахола в

бескальциевой среде. Эксперименты с подавлением активности кальциевых каналов L типа селективными ингибиторами верапамилом и амлодипином показали, что верапамил практически полностью ингибировал активность каналов этого типа при добавлении карбахола. Волокно при этом начинало медленно выпускать Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в цитоплазму за счет электромеханического сопряжения. Добавление амлодипина также значительно снижало уровень сигнала флуоресценции от кальциевого зонда. Было обнаружено также, что адреналин и норадреналин вызывали поступление Ca^{2+} в цитоплазму сателлитных клеток (рис. 2 в, г). Однако верапамил и амлодипин не ингибировали действие адреналина или норадреналина и концентрация Ca^{2+} в цитоплазме сателлитных клеток увеличивалась (рис. 2 д, е). В бескальциевой среде адреналин вызывал выброс кальция в цитоплазму, что может свидетельствовать о наличии кальцийзапасяющих депо в сателлитных клетках (рис. 2 ж, з). При использовании селективного блокатора $\beta 2$ адренорецепторов ICI 118551 уровень сигнала от цитоплазмы сателлитных клеток не повышался после добавки адреналина в среде с кальцием, что свидетельствует о регуляторной роли этих рецепторов в сателлитных клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано присутствие функционирующих потенциалзависимых кальциевых каналов L типа Cav1.3 в сателлитных клетках. Активность каналов L типа ассоциирована с деполяризацией клеточной мембраны вследствие функционирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, локализованных на плазмалемме сателлитных клеток. На основании полученных данных можно сделать вывод об участии каналов Cav1.3 в модуляции уровня цитоплазматического кальция в сателлитных клетках. Вероятно, этот способ регуляции Ca^{2+} не является основным, а функционирует вместе с присутствующими в этих клетках механизмами освобождения ретикулярных запасов Ca^{2+} . По видимому, каналы Cav1.3 могут быть важным источником поступления внеклеточного кальция в сателлитные клетки и миообласты на протяжении всего периода пролиферации и дифференцировки.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ

1. Bidaud I., Monteil A., Nargeot J. et al. Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2006. V. 27. № 1. P. 75–81.
2. Chahine M., Qu Y., Mancarella S., Boutjdir M. Protein kinase C activation inhibits alpha1D L type Ca channel: a single channel analysis // *Pflugers Arch.* 2008. V. 455. № 5. P. 913–919.
3. Kislinger T., Gramolini A.O., Pan Y. et al. Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation // *Mol. Cell. Proteomics.* 2005. V. 4. № 7. P. 887–901.

4. Mahapatra S., Marcantoni A., Zuccotti A. et al. Equal sensitivity of Cav1.2 and Cav1.3 channels to the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells // *J. Physiol.* 2012. V. 590. № 20. P. 5053–5073.
5. McHugh D., Sharp E.M., Scheuer T., Catterall W.A. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. №22. P. 12334–12338.
6. Qu Y., Baroudi G., Yue Y. et al. Localization and modulation of alpha1D (Cav1.3) L-type Ca channel by protein kinase A // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005. V. 288. № 5. P. 2123–2130.
7. Seino S., Chen L., Seino M. et al. Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. №. 2. P. 584–588.

Раздел 3.2. Исследование механизмов секреции матриксных металлопротеиназ клетками эндометрия человека, являющихся причиной развития эндометриоза. выявление нарушений в механизмах секреции матриксных металлопротеиназ при развитии эндометриоза.

ВВЕДЕНИЕ

Повышенная секреция матриксных металлопротеиназ-9 (ММР-9) в клетках эндометрия сопутствует эндометриозу (Chen *et al.*, 2004; Collette *et al.*, 2004). Однако молекулярный механизм секреции ММР-9 изучен недостаточно (Itoh *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2013). Ранее мы установили, что карбахол, соединение близкое по строению к естественному агонисту ацетилхолиновых рецепторов ацетилхолину, вызывает секрецию ММР-9 в ткани эндометрия. Целью данной работы является изучение молекулярного механизма секреции ММР-9 клетками эндометрия и установление особенности данного механизма при эндометриозе.

В 2016 году было выполнено два этапа исследования. Целью первого этапа было определение рецепторов, на которые воздействует карбахол при секреции ММР-9. Цель второго этапа - изучение уровня секреции ММР-9 клетками эндометрия при эндометриозе и в норме при действии карбахола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала осуществлялся у пациенток после одобрения этическим комитетом и подписания пациентками информированного согласия в Научном Центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава РФ. Образцы биопсий эндометрия, взятые на 9-12 сутки менструального цикла, помещали в пробирку со средой DMEM/F12,

содержащей антибиотика (пенициллин, стрептомицин по 50 ед/мл). В ламинарном шкафу ткань эндометрия промывали в нескольких сменах среды DMEM/F12 с добавлением антибиотика до исчезновения видимых следов крови. После этого каждый из образцов механически измельчался стерильным одноразовым скальпелем до получения однородной суспензии. Далее образцы эндометрия инкубировали в 0,2%-ном растворе коллагеназы тип IV в среде DMEM/F12 в течение 30 мин при 37⁰С. Раствор, содержащий коллагеназу, удаляли центрифугированием (5 мин 300g), затем добавляли среду DMEM/F12 без антибиотика, содержащую 10%-ов FBS. Полученную суспензию переносили в 48-луночные планшеты и помещали в CO₂-инкубатор при 37⁰С и 5% CO₂. Количество клеток в лунке планшета варьировало в диапазоне от 200 тыс. до 600 тыс. Для проведения ПЦР анализа выделение РНК производили при помощи набора RNeasy Micro Kit согласно протоколу, рекомендованному производителем. Концентрацию выделенной РНК измеряли при помощи спектрофотометра (DeNovix, USA), после чего необходимое количество РНК брали в реакцию ОТ, которую ставили с использованием праймеров Oligo(dT) и набора для ОТ по рекомендациям производителя. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР. В качестве референтного гена был использован *RPL19*. Для выявления экспрессии генов $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов исследована экспрессия гена *CHRNA7*. Все праймеры приведены в таблице 1. ПЦР проводили в Real-Time PCR Detection System CFX96 (Bio Rad, USA). Условия проведения ПЦР представлены в таблице 2. Секвенирование проводили в сервисной лаборатории “Синтол” (Россия). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе “ABI Prism 3100” (“Applied Biosystems Inc.”, USA). Для проведения вестерн-блота пробы гомогенизировали в RIPA-буфере с протеазным и фосфатазным ингибиторными коктейлями. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 12000g, супернатант разводили в двукратном буфере Лэмли. Концентрацию белка определяли с помощью Bradford Protein Assay. Электрофорез проводили в 12%-ном разделяющем и 6%-ном концентрирующем акриламидных гелях. Перенос белков производился на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали в растворе 4%-ного сухого молока на PBST в течение 1 ч. Для выявления белка были использованы первичные моноклональные антитела против $\alpha 7$ nAChR в разведении 1/200 и моноклональные антитела против GAPDH в разведении 1/500. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение 12 час при 4⁰С, с вторичными антителами - 1 час при комнатной температуре. Блоты отмывались 3 раз по 10 мин в PBST. Выявление белковых полос осуществлялось с помощью набора ImmunStar Substrate Kit. Интенсивность хемилюминесценции оценивали при помощи системы ChemiDoc XRS+ (Bio Rad). Для проведения MMP-9 иммуноферментного анализа клетки эндометрия инкубировали в течение 24 ч, как описано выше, в 48-луночных планшетах. Затем среду, содержащую сыворотку, удаляли из культуры, и клетки промывали три раза раствором HBSS. После этого клетки инкубировали в 250 мкл HBSS при

37°C. Через 1ч 100 мкл надклеточной жидкости забирали для иммуноферментного анализа (ИФА). После добавляли к клеткам карбахол в конечной концентрации 100мкМ или РНА 543613 в конечной концентрации 1мкМ. Инкубация длилась в течение трех минут. После этого 100 мкл надклеточной жидкости забирали для ИФА. Далее из клеток выделяли ДНК с помощью набора «К-сорб» и на основании концентрации ДНК, определенной с использованием спектрофотометра, определяли количество клеток в эксперименте. Для обнаружения ММР-9 проводили ИФА в соответствии с протоколом производителя. Результаты представлены в виде разницы между количеством ММР-9 непосредственно до добавления карбахола или РНА 543613 и через 3 мин после. Данные выражены в пг на 1000 клеток в лунке в виде среднего значения \pm ошибка среднего. Статистическая обработка выполнена с использованием однофакторного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что наиболее перспективными рецепторами для изучения секреции ММР-9 были $\alpha 7$ никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChRs), которые регулируют импульсную секрецию в нервной ткани и хромаффинных клетках. (Gotti *et al.*, 2006; Sala *et al.*, 2008). В процессе исследования была установлена экспрессия $\alpha 7$ nAChR в ткани эндометрия как на уровне мРНК методом полимеразной цепной реакции (рис.1), так и на уровне белка методом вестерн-блоттинга (рис. 2). Также было показано, что при добавлении агониста ацетилхолиновых рецепторов карбахола или селективного активатора $\alpha 7$ nAChR РНА 543613 к первичной культуре клеток эндометрия наблюдается регулируемая секреция матриксных металлопротеиназ-9 (рис. 3). Для оценки концентрации ММР-9, секретлируемой клетками эндометрия была исследована надклеточная жидкость до и после добавления активатора методом ИФА. Таким образом, мы установили, что при активации $\alpha 7$ nAChR происходит секреция ММР-9.

Далее было проведено сравнение экспрессии ММР-9 при активации $\alpha 7$ nAChR кабахолом в первичной культуре, полученной из шести образцов ткани эндометрия у пациенток со II – III стадией развития эндометриоза согласно классификации Американского общества акушеров-гинекологов и шести образцов эндометрия пациенток, проходивших в НЦАГиП плановое лечение по поводу, не связанному с данной патологией. Было установлено, что после внесения карбахола уровень секреции ММР-9 клетками эндометрия в группе эндометриоза выше в 10 раз, чем в контрольной группе (составил 1020 пг на 1000 клеток (925; 185, 1950) и в контрольной группе 106 пг на 1000 клеток (95; 0, 220). Достоверность $p < 0,03$ (рис. 4).

В связи с тем, что карбахол близок по строению к естественному агонисту ацетилхолиновых рецепторов ацетилхолину и активирует как мускариновые, так и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, можно ожидать, что уровень наблюдаемой секреции ММР-9 будет соответствовать физиологическому. Полученные данные свидетельствуют о том, что одним из

возможных терапевтических подходов к лечению эндометриоза может быть блокирование активации $\alpha 7$ nAChRs.

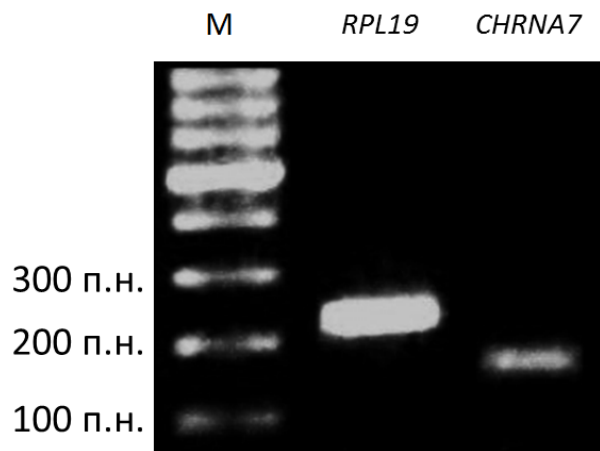


Рис.1 Электрофорез продуктов ПЦР комплементарной ДНК полученной из клеток эндометрия. Используются праймеры к генам CHRNA7 и RPL19. М – маркер длины ДНК.

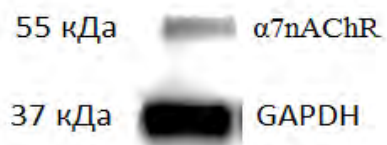


Рис. 2 Вестерн-блоттинг анализ экспрессии белка $\alpha 7$ nAChR и GAPDH в клетках эндометрия.

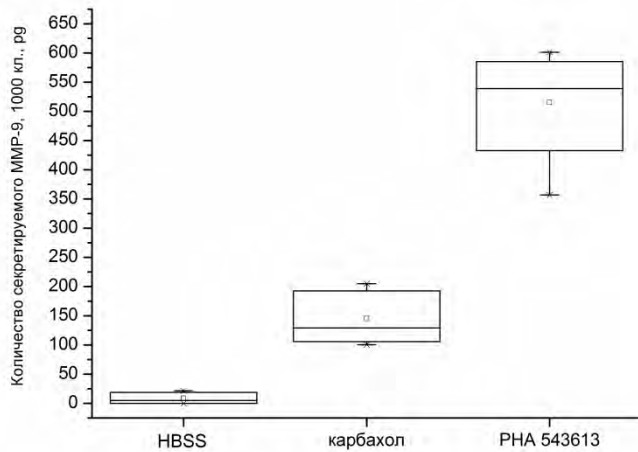


Рис. 3 Количество секретируемого MMP-9 культурой клеток эндометрия в ответ на воздействие карбахола, PNA 543613, HBSS. * – максимальные и минимальные значения, □ – средние значения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ (раздел 3).

1. **Почаев В.А., Красный А.М., Озернюк Н.Д.** Поступление Ca^{2+} через кальциевые каналы Cav.1.3 в сателлитных клетках мышечных волокон крысы // Известия РАН. Серия биол. 2013. № 5. С. 522-529.
2. **Красный А.М.,** Кан Н.Е., Тютюнник В.Л., Ховхаева П.А., Волгина Н.Е., Сергунина О.А., Тютюнник Н.В., Беднягин Л.А. Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности // Акушерство и гинекология. 2016. № 5. С. 90-94. <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.5.90-94>
3. Волгина Н.Е., Садекова А.А., Щипицына В.С., **Красный А.М.** Секреция матриксных металлопротеиназ MMP-9 клетками эндометрия // Медицинский академический журнал. 2016. №4. С. 122-123.

Раздел 4. СИГНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ. ВЛИЯНИЕ ДОФАМИНА НА КИНЕТИКУ СИНТЕЗА БЕЛКА.

Ключевые слова: межклеточные взаимодействия, синхронизация функций, старение, синтез белка, гепатоциты, кератиноциты, дофамин, глутаминовая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Прямые взаимодействия клеток определяют образование и выделение в межклеточную среду специфических сигнальных факторов, от которых зависит дифференциальная активность генов на разных фазах эмбрионального развития, постнатальных дифференцировок, регенерации (эффекты «ниши»). На регуляцию функций дифференцированных клеток также влияют сигнальные факторы микроокружения. Наши исследования относятся к последней проблеме и являются в международной литературе приоритетными. Новизна определена обоснованием адекватной модели для исследований прямых межклеточных взаимодействий. Адекватность обусловлена тем, что взаимодействия клеток дополняют нервные и гормональные регуляции и являются существенными при патологии и старении млекопитающих. В настоящем проекте основное внимание было сосредоточено на расширении набора сигнальных факторов – дофамина и глутаминовой кислоты. Исследовано влияние деградации белков на кинетику синтеза белка и межклеточные взаимодействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные культуры гепатоцитов. Основные опыты ставили на культурах гепатоцитов, полученных из печени крыс линии Вистар (возраст 3-3,5 мес, вес 250-270 г). Печень крысы перфузировали бескальциевым раствором Хенкса с 0.5 мМ ЭДТА и 0.05%-ным раствором коллагеназы (Sigma, США) в среде 199. Суспензию, содержащую около 90% жизнеспособных гепатоцитов, разводили средой до концентрации около 10^6 или 10^5 клеток/мл, получая из одной клеточной суспензии, соответственно, плотные культуры с близко расположенными клетками или разреженные культуры. Суспензию с требуемой концентрацией клеток наливали в чашки Петри над стеклами, покрытыми коллагеном. Обычно суммарная площадь стекол была около 50 см^2 , а объем культуральной среды – 50 мл. Через 2 ч стекла с прикрепившимися клетками отмывали от неприкрепленных клеток и клеточных обломков и помещали в свежую среду. Клетки культивировали без эмбриональной сыворотки в среде 199 с добавлением 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma); газовая фаза – 95% воздуха и 5% CO_2 . Через 1 сут культуры опять промывали и исследовали кинетику синтеза белка. В некоторых опытах использовали и 2-суточные культуры. Данные сравнивали с культурами кератиноцитов.

Культуры кератиноцитов кожи человека, линия HaCaT. В нашей работе клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамина (ПанЭКО), снимали смесью 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco). Пассировали раз в 3-5 дней в соотношении 1:4 – 1:6. Для целей наших опытов суспензию клеток переносили в бессывороточную среду: среда 199 с 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/ мл инсулина (Sigma); газовая фаза содержала 95% воздуха и 5% CO₂. Суспензию, содержащую 4-5x10⁶ клеток в 1 мл среды, вносили в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Площадь каждого стекла примерно 1 см². Получали плотные культуры с близко расположенными клетками (Рис. 1). Через сутки культуры отмывали и переносили в свежую среду.

Культуры мезенхимных стромальных клеток. В наших опытах [Бродский и др. 2012] исследовали МСК, выделенные из биоптатов жировой ткани, полученных после абдоминальной пластики. Клетки культивировали в среде DMEM с 10% сыворотки, 5мкг/мл инсулина, 10мкг/мл трансферрина и 10нг/мл селенита натрия. Смену среды осуществляли каждые 3-е суток. По достижении монослоя клетки пассировали с использованием растворов 0,05% трипсина (Панэко) и Версена (Панэко). На 3-4 пассаже клетки замораживали для долгосрочного хранения (при -196°C), в качестве криопротектора использовали 10% ДМСО. Для экспериментов нашей работы клетки размораживали и культивировали в течение 2-3 недель. В работе использовали клетки 8-12 пассажей. Затем клетки снимали с пластика по стандартной методике с помощью растворов Версена и трипсина, клетки суспендировали, центрифугировали 10 мин при 200g. Клеточный осадок ресуспендировали в бессывороточной среде (среда 199 с добавлением 0,5 мкг/мл инсулина (Sigma) и 0,2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и далее содержали в этой среде. Суспензию, содержащую около 10⁶ клеток в мл среды, вносили в чашку Петри с 30 мл среды над стеклами, покрытыми коллагеном. Через 3 часа культуры отмывали и переносили в свежую среду. Еще через 2 часа культуры вновь отмывали и через 15-60 мин исследовали кинетику синтеза белка. В части опытов исследовали МСК из костного мозга крысы.

Исследования кинетики синтеза белка. Для оценки интенсивности синтеза белка и определения кинетики синтеза культуры гепатоцитов тщательно отмывали и переносили в свежую среду – чистую (контроль) или содержащую испытуемые вещества. Интенсивность синтеза белка определяли по включению ³Н-лейцина в белки с поправкой на пул свободного лейцина в той же культуре. Каждую культуру инкубировали в течение 10 мин при 37°C в среде с ³Н-лейцином (6-8 x 10¹⁰ Бк / мл, специфическая активность 12- 20 x 10¹⁰ Бк / ммоль). Далее культуры промывали холодной средой и обрабатывали холодной (4°C) хлорной кислотой 90 мин, промывали этиловым спиртом и белки растворяли гиамином (бензетониум гидроксид, Sigma). Радиоактивность лейцина в белках и кислоторастворимой фракции, т.е. свободного лейцина в клетках, измеряли для каждой

культуры отдельно, используя сцинтилляционный счетчик LKB 1214 Rackbeta (Швеция). Относительное включение лейцина I_{corr} , характеризующее интенсивность синтеза белка, рассчитывали по формуле

$$I_{corr} = I_i \times P_v / P_i \text{ (имп/мин), где}$$

I_i – включение лейцина в белки за 10 мин, P_i – общая радиоактивность определенной культуры
 $P_i = I_i + p_i$, где p_i – радиоактивность пула той же культуры, а P_v – средняя радиоактивность культур определенного опыта (для 2 ч – 36 культур). В относительной величине I_{corr} вводится поправка на пул ^3H -лейцина, на варьирующее число клеток в разных культурах и, как показали наши наблюдения, на небольшие вариации температуры и pH среды в течение опыта. В течение 2 час последовательно каждые 10 мин брали три параллельные пробы культур; для каждой культуры определяли I_{corr} и рассчитывали среднее и ошибку для определенной точки времени
Амплитуду колебаний интенсивности синтеза белка определяли как

$$(I_{corr \max} - I_{corr \min}) / I_{corr \text{ average}},$$

то есть как разницу между максимальной и минимальной величинами I_{corr} по отношению (в процентах) к средней I_{corr} для всего опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали плотные суточные культуры гепатоцитов крысы в бессывороточной среде на стеклах, покрытых коллагеном. Как и ранее, в контрольных культурах в свежей среде наблюдали окологасовой ритм синтеза белка. После добавления в среду с такими культурами 1 – 10 мкМ дофамина ритма не было. После введения в среду с культурами, предобработанными дофамином, 0.3 мкМ ганглиозидов наблюдали ритм. Дофамин, вероятно, влияет на кондиционирование межклеточной среды ганглиозидами. Недостаток этого эндогенного синхронизирующего фактора в межклеточной среде блокирует самоорганизацию ритма синтеза белка. Таким образом, в отличие от ранее изученных норадреналина и серотонина, а также ганглиозидов, организующих популяционный ритм синтеза белка, дофамин дезорганизует ритм, нарушает прямые межклеточные взаимодействия. Крысам Вистар весом 300-400 г (3-4 мес) вводили дофамин внутривенно (9 мкг/кг) или внутрибрюшинно (15 мкг/кг), через 40 мин выделяли гепатоциты и ставили плотные культуры на стеклах, покрытых коллагеном. Через 5 час в таких культурах не выявлен окологасовой ритм синтеза белка, тогда как после введения крысе физиологического раствора NaCl в культурах ее гепатоцитов наблюдали ритм. Дезорганизующий ритм эффект дофамина обратим: при выделении гепатоцитов через сутки после введения крысе дофамина в культурах наблюдали ритм. Действие дофамина купируется мелатонином: после введения крысе внутрибрюшинно дофамина (15 мкг/кг) и еще через 40 мин мелатонина (32 нг/кг) в 5-час культурах гепатоцитов обнаружили ритм синтеза белка. В пользу прямого действия дофамина на

клетки печени *in vivo* говорят наши предшествующие опыты *in vitro* с введением дофамина в среду с культурами гепатоцитов. Результаты обсуждаются в связи данными о биохимических механизмах прямых межклеточных взаимодействий и ранее неизвестных свойств катехоламинов.

Исследовано влияние глутаминовой кислоты на кинетику синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов крысы. После добавления глутаминовой кислоты (0.2 мг/мл) к среде с несинхронными культурами гепатоцитов в них выявлялся окологосовой ритм синтеза белка; в контроле, в таких же культурах, но в среде без глутаминовой кислоты, ритм не обнаруживался. Антагонист метаболитных рецепторов глутаминовой кислоты – MCPG (0.01 мг/мл), введенный в среду вместе с глутаминовой кислотой, ликвидировал её организующую функцию: ритм не обнаруживался. Н7 – ингибитор протеинкиназ (0.014 мг/мл), введенный в среду вместе с глутаминовой кислотой, также прекращал организацию ритма синтеза белка. После кормления крыс хлебом с глутаминовой кислотой (30 мг), в культурах гепатоцитов, выделенных от таких крыс, находили ритм; после такой же пищи, но без глутаминовой кислоты, ритма не было. Таким образом, глутаминовая кислота, компонент крови млекопитающих, ненервный трансмиттер синхронизирует активность гепатоцитов, организуя ритм синтеза белка *in vitro* и *in vivo*. Обсуждается биохимический механизм межклеточной кооперации и значимость ненервных функций нейротрансмиттеров. Глутаминовая кислота используется в клинике; влияние на кинетику синтеза белка дополняет ранее известные свойства лекарства.

В следующей работе изучили негативный контроль прямых межклеточных взаимодействий, влияние активности протеасом и секреции белка на его кинетику. Исследовано влияние торможения активности протеасом на прямые межклеточные взаимодействия в первичных культурах гепатоцитов. Маркер межклеточных коммуникаций – окологосовой ритм синтеза белка. Введение ингибитора протеасом MG132 в дозах 10 или 20 мкМ в среду с культурами гепатоцитов на 19 час приводит к значительному снижению суммарного пула ³H-лейцина в клетках. Включение лейцина в белки изменяется мало или не изменяется, падает содержание свободного меченого лейцина в гепатоцитах. Искажается сравнительно с контролем ритм синтеза белка. Ритм восстанавливается внешними организаторами – ганглиозидами и мелатонином, а также при усилении активности протеинкиназ – ключевого фактора организации ритма синтеза белка. Кратковременное 3-час действие MG132 не изменяет пул лейцина, но ритм синтеза белка также нарушается. Таким образом, катаболизм белков влияет на межклеточные взаимодействия, организующие ритм синтеза белка. Другой фактор негативного контроля ритма синтеза белка – секреция белков из гепатоцитов, показанная *in vivo* во многих исследованиях, выявлена и в нашей работе при измерениях белков, окрашенных кумасси бриллиантовым синим G250 в среде с культурами гепатоцитов.

В обзоре (В.Я. Бродский. Околочасовые метаболические ритмы. Биохимия 2014, 79, 6, 621-634) рассмотрена литература по клеточным околочасовым ритмам. Для исследований, приведенных в настоящем отчете, такие ритмы служат маркером прямых межклеточных отношений, что также основано в работах ИБР. Рассмотрены данные о распространении околочасовых ритмах, свойственных разным сторонам метаболизма клеток, их физиологии, а также поведению организмов. Дается анализ сведений о природе околочасовых ритмов и их значимости для биологии и медицины.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

- 1 Бродский В.Я., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д., Конченко Д.С., Мальченко Л.А.** Дофамин дезорганизует ритм синтеза белка, нарушая самоорганизацию гепатоцитов *in vitro*. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед.. 2013. Т.156. №7. С. 45-48
- 2 Звездина Н.Д., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Бродский В.Я.** Действие сигнала, организующего ритм синтеза белка, сохраняется сутки после однократного введения мелатонина крысе // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2013. Т.156. № 9. С. 298-301.
- 3 Бродский В.Я.** Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия 2014. Т.79. № 6. С. 621-634.
- 4 Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Дубовая Т.К., Конченко Д.С., Звездина Н.Д.** Дофамин, введенный крысе, дезорганизует ритм синтеза белка в гепатоцитах // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2014. Т.157. №2. С.182-185.
- 5 Бродский В.Я., Шарова Н.П., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.** Блокирование активности протеасом нарушает ритм синтеза белка – маркера прямых межклеточных взаимодействий // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 1. С. 44-52.
- 6 Бродский В.Я., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Звездина Н.Д., Дубовая Т.К.** Глутаминовая кислота - аминокислота, нейротрансмиттер, лекарство - организует ритм синтеза белка в гепатоцитах *in vitro* и *in vivo* // Биохимия. 2016. Т. 81. В. 8. С. 1130-1136.
- 7 Бродский В.Я., Воротеляк Е.А., Терских В.В., Васильев А.В., Мальченко Л.А., Конченко Д.С., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д.** Дофаминам дезорганизует прямые межклеточные взаимодействия в культурах кератиноцитов; сравнение с гепатоцитами Онтогенез. 2016, 47, №2, 92-98.

Раздел 5. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: БИОРЕГУЛЯТОРЫ ОРГАННОГО И ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было показано, что в тканях животных на поверхности клеток локализованы ранее не изученные адгезивные макромолекулярные факторы, белковой природы, которые с очень низких дозах оказывают влияние на пролиферацию, дифференцировку клеток *in vitro*. Эти адгезивные белки проявляли устойчивость к воздействию ряда физико-химических факторов, проявляли выраженную тенденцию к образованию крупных наноразмерных частиц в растворах. Исследованию биологического действия на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, а также изучению состава и структуры данных адгезивных молекул, были посвящены работы за отчетный период.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биорегуляторы данной группы выделяют из свежеполученных тканей крупного рогатого скота – материал бойни мясоперерабатывающих заводов Москвы и Московской области. МГТБ растительного происхождения получают из листьев свежесобранных растений ВИЛАР или других сельскохозяйственных организаций.

На первом этапе исследования получают тканевые экстракты, обрабатывая ткани животных или растений водно-солевыми растворами определенного состава. Тканевые экстракты далее фракционируют с помощью методов биохимии и исследуя активность каждой фракции – мембранотропную активность на гепатоцитах млекопитающих *in vitro*. Для очистки пептидно-белковых комплексов применяют методы электрофореза в ПААГ, хроматографические методы, в том числе, обращенно-фазовой хроматографии. Идентификацию компонентов МГТБ проводили методами масс-спектрометрии (MALDI TOF, электроспрей)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая отсутствия видоспецифического характера биологической активности МГТБ животного происхождения, для ее исследования применяли различные модели, некоторые из них были разработаны впервые – это роллерные органотипические культуры тканей позвоночных животных (в том числе, и амфибий). В процессе исследования было показано, что, МГТБ, выделенный из сыворотки крови быка, стимулирует репарацию кожных ран и костных дефектов у экспериментальных животных *in vivo*, способствуя восстановлению структуры поврежденной ткани. Биорегулятор, выделенный из пигментного эпителия глаза быка, способствует

поддержанию структуры данной ткани на модели культуры заднего отдела глаза тритона *in vitro*. Биорегулятор, выделенный из поджелудочной железы быка, проявляет выраженное протекторное действие на модели экспериментального диабета у крыс *in vivo*. На новой модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* было показано, что МГТБ, выделенные из ряда растений и тканей животных проявляют гепатопротекторное действие (Табл.1). Параметр, отражающий гепатопротекторное действие МГТБ, представлял собою площадь пигментированных клеток печени, обеспечивающих защитную функцию организма амфибии в неблагоприятных условиях.

Таблица 1. Действие биорегуляторов растительного и животного происхождения на состояние печени тритона в условиях роллерного органотипического культивирования ткани тритона *Pleurodeles waltl*

№	Источник получения биорегуляторов	Биологически активная доза (мг белка/мл)	Площадь пигментированных клеток в печени тритона (%)
1	Чистотел большой <i>Chelidonium majus</i> L. (листья, стебель)	10^{-8}	6.7±1.4 (p<0.05)
		10^{-2}	4.5±1.1 (p<0.05)
2	Полынь горькая <i>Artemisia absinthium</i> L. (листья, стебель)	10^{-12}	7.5±1.3(p<0.05)
3	Укроп пахучий <i>Anethum graveolens</i> L. (листья, стебель)	10^{-12}	9.0±3.7 (p<0.05)
4	Зверобой продырявленный <i>Hypericum perforatum</i> L. (листья, стебель)	10^{-12}	8.5±2.6 (p<0.05)
5	Гепатопанкреас краба камчатского <i>Paralithodes camtschaticus</i>	10^{-10}	5.52±0.6 (p<0.02)
6	Печень крысы Wistar	10^{-14}	5.52±0.6 (p<0.02)
7	Эссенциале форте – лекарственный препарат	3×10^{-4}	5.41±0.8 (p<0.05)
8	Контроль	-	5.16±0.9
9	Нативная ткань тритона	-	4.78±0.05

Результаты, полученные на этой экспериментальной модели *in vitro*, были подтверждены на модели CCl₄-индуцированного фиброза печени у крысы *in vivo*. Было показано, что ряд МГТБ, выделенных из тканей животных, растений (в том числе, чистотела большого *Chelidonium majus*), а также грибов (*Fusarium s.*), оказывает протекторное действие на клетки печени, что выражается в подавлении развития фиброза и нормализации биохимических показателей работы печени.

На модели экспериментальной язвы желудка у крыс *in vivo* показано, что прием питьевого раствора МГТБ сыворотки крови в СМД стимулировал процессы восстановления слизистой желудка, образованию в области язвы плотного эластичного рубца; на 5-ый день после операции в группе, получавшей препарат индекс язвы $16,2 \pm 3,5$ мм², в то время, как в контрольной группе - $30,6 \pm 4,8$ мм². Показано выраженное протекторное действие данного препарата на состояние двенадцатиперстной кишки: отсутствовали признаки воспаления и отечности, по сравнению с контрольной группой. Состояние ткани двенадцатиперстной кишки соответствовало нативному.

При исследовании биологического действия МГТБ растительного происхождения в экстракте чеснока посевного *Allium sativum* L. была обнаружена фракция, проявляющая мембранотропную активность, в составе которой было обнаружено соединение 2-(гидроксиэтилтио)-бензотиазол. Было показано, что в концентрации, соответствующей 10^{-11} мг/мл, данная фракция оказывала гепатопротекторное действие на клетки печени тритона, а также представляла собой эффективное средство защиты табака от вируса табачной мозаики, что выражалось в достоверном снижении на обработанных ею листьях табака количества некрозов, вызываемых заражением вирусом. Биологическая эффективность применения данной фракции составляла 92,9%. Кроме того, данная фракция оказывала защитное действие против гелиминтоспориозных и фузариозных гнилей ярового ячменя и яровой пшеницы в условиях предпосевной обработки семян растений. Биологическая эффективность применения изучаемого природного соединения составляла 61,5 и 65% в случае ячменя и пшеницы, соответственно. Важно отметить, что синтетически полученное соединение 2-(гидроксиэтилтио)-бензотиазол в различных концентрациях не проявляло данной биологической активности. В экстракте чеснока посевного *Allium sativum* L., был обнаружен комплекс лектин-аллиаза, который в концентрации, соответствующей 10^{-14} мг/мл, оказался эффективным против темно-бурого гелиминтоспориоза на изолированных листьях ячменя и пшеницы, бурой ржавчины пшеницы, пирикулярноза риса, а также огуречной пятнистости. Полученные данные указывают на способность некоторых фракций экстракта чеснока посевного *Allium sativum* L. проявляющих мембранотропную активность, характерную для МГТБ, и имеющих сложное строение, оказывать выраженное защитное действие у растений при ряде распространенных заболеваний сельскохозяйственных культур.

За отчетный период были изучены состав и строение МГТБ, выделенных из тканей млекопитающих. Было показано, что МГТБ представляют собой пептидно-белковые комплексы, где за биологическое действие ответственны небольшие пептиды (мол.масса от 1300 до 5000 Да), представляющие собой продукты протеолиза мембранных белков межклеточного пространства; белки-модуляторы влияют на биологическое действие данных пептидов. Были изучены белки-модуляторы, которые в случае МГТБ животного происхождения представляют собой белки

семейства сывороточного альбумина, характеризующиеся присутствием в полипептидной цепи 4-х переменных положений аминокислот **-116, 214, 429, 579** (для тканей КРС), а белки-модуляторы, выделенные из тканей крыс Wistar, содержат в полипептидной цепи 3 переменные положения аминокислот – **262, 317, 431** (табл.2-3)

Таблица 2. Альбумины, входящие в состав МГТБ, выделенных из различных тканей КРС

№ п/п	Ткань – источник получения МГТБ	Номер белка в базе данных	Положения аминокислот в изоформах сывороточного альбумина
1	Сыворотка, стекловидное тело, склера, цилиарное тело, радужка, пещеристое тело, яичники	gi 1351907	116- Glu 214 - Ala 429 - Ala 579 - Asp
2	ПЭ, роговица, зрительный нерв	gi 367460260	214 – Thr

Таблица 3. Альбумины, входящие в состав МГТБ, выделенных из различных тканей крыс Wistar

1	Легкое	gi 158138568	262 – Leu 317 – Thr 431 – Ile
2	Печень	gi 55628	317 – Thr 431 – Val
3	Сыворотка крови	gi 124028612	262 – Val 317 – Ile 431 – Val

Установлена первичная структура пептидов, входящих в состав нескольких МГТБ. Для нескольких пептидов, выделенных из сывороточного МГТБ, показана их гомология: одного - с Р-кадгеринном; другого-с фрагментом киназного домена регуляторного белка *tribble* – 2, полученного из гранулоцитов. Для одного из пептидов МГТБ, выделенного из мозга крыс – гомология с N-концевой последовательностью гуанидин-нуклеотидсвязанного G α -белка (суб. единицы альфа 1). Для пептида МГТБ пигментного эпителия глаза быка – гомология с N-концевой последовательностью фосфодиэстеразы цикл. ГМФ субъединицы гамма, выделенной из сетчатки глаза быка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из тканей млекопитающих, а также растений, беспозвоночных морских животных и грибов, выделены и исследованы в аспекте установления состава и структуры, биологического действия

новые эндогенные биорегуляторы, получившие название мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). Показано, что в сверхмалых дозах данные биорегуляторы влияют на вязко-упругие свойства плазматической мембраны млекопитающих *in vitro*, а также проявляют выраженное протекторное действие на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, которое имеет тканеспецифический, но не видоспецифический характер. На экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что МГТБ стимулируют восстановление и регенерацию в патологически измененных тканях. На основе биорегуляторов данной группы разработаны препараты, которые можно применять в регенеративной медицине. МГТБ животного происхождения представляют собой пептидно-белковые комплексы, в состав которых входят биологически активные небольшие пептиды (от 1300Да до 5000Да) и белки, модулирующие их активность. Эти белки-модуляторы представляют собой белки суперсемейства сывороточных альбуминов. Показано, что тканеспецифический характер биорегуляторов данной группы определяют определенный состав пептидов – продуктов протеолиза мембранных или адгезивных белков, и определенная изоформа альбумина сыворотки крови. При исследовании биологического действия ряда фракций, выделенных из экстрактов растений, было обнаружено, что их защитное действие, проявляемое в низких дозах, от распространенных заболеваний сельскохозяйственных культур.

ПАТЕНТ:

1. RU 2481121 «Противоожоговый гель» от 10 мая 2013г. Авторы: Ямсков И.А., Ямскова В.П., Шайхалиев А.И., Полякова А.Г., Ижбирдиев Э.Н., Тихонов В.Е., Рыбакова Е.Ю., Галкин О.М., Стречкий Г.М., Краснов М.С.
2. RU Патент. Заявка № 2016104834 Ингибитор вируса табачной мозаики. О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, Б.Б. Березин, А.П. Ильина, М.И. Карташов, Ямскова В.П., Ямсков И.А.
3. RU Патент. Заявка № 2016133297 Средство защиты пшеницы и ячменя от гельминтоспориоза. О.Г. Куликова, М.И. Карташов, Ямскова В.П., Ямсков И.А.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ

1. Шайхалиев А.И., Стречкий Г.М., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю., Тихонов В.Е., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Действие новых композиций на восстановление костных дефектов у крыс в эксперименте // Фундаментальные исследования. №9. часть 2. 2013. С. 271-276.
2. Богданов В. В., Фаткулина Э. Ф., Березин Б. Б., Ильина А. П., Ямскова В. П., Ямсков И. А. Пептидосодержащая фракция из культуральной среды *Fusarium sambucinum*: состав и биологическое действие // Прикладная биохимия и микробиология, 2014, т. 50, № 2, С. 177–183.

3. Ильина А.П., Молявка А.А., Ямскова В.П., Буряк А.К., Ямсков И.А. Исследование структуры биорегулятора, выделенного из головного мозга крыс // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 442-448.
4. Краснов М.С., Ямскова В.П., Березин Б.Б., Ямскова Н.В., Ямсков И.А. Исследование биорегулятора, выделенного из семенников крыс, на модели роллерного органотипического культивирования семенников мыши *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. № 1. С. 63-67.
5. Краснов М.С., Богданов В.В., Куликова О.Г., Ильина А.П., Березин Б.Б., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов новой группы, выделенных из тканей моллюска (*Margaritifera Margaritifera*) и ряда растений // Фундаментальные исследования. 2014. №5. часть 1. С. 63-70.
6. Мальцев Д.И., Новикова Ю.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Иммуногистохимическое исследование печени тритона в условиях роллерного органотипического культивирования *in vitro* // Фундаментальные исследования. 2014. №5. часть 4. С. 752-759.
7. Олькова А.С., Краснов М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Влияние новых пептидных биорегуляторов на активность *Daphnia magna* в чистых и загрязненных тяжелыми металлами водах // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5; URL: <http://www.science-education.ru/128-21927> (дата обращения: 02.10.2015).
8. Налобин Д.С., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Краснов М.С., Алипкина С.И., Сырчина М.С., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Исследование влияния биорегуляторов, выделенных из печени и сыворотки крови млекопитающих, на развитие фиброза печени мыши // Фундаментальные исследования. 2015. № 7 (часть 1). С.48-56.
9. Куликова О.Г., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Бурдина А.В., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Биологически активные пептиды, выделенные из укропа пахучего *Anethum graveolens* L. // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т.51. №3. С.362-366.
10. Богданов В. В., Березин Б. Б., Ильина А. П., Ямскова В. П., Ямсков И. А. Биологически активные пептиды гепатопанкреаса камчатского краба // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т.51. № 4. С.1–7.
11. Kulikova O.G., Maltsev D.I., Pyina A. P., Yamskova V. P., Yamskov I. A. Hepatoprotective Activity of Plant Peptides // American Journal of Plant Sciences. 2015. V.6. P.848-855.
12. Kulikova O.G., Pyina A.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A.. Composition of Bioregulators Obtained from Garlic, *Allium sativum* L. // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. Nova Science Publishers. 2015. V. 9. I. 2. P. 499-508.

13. Kulikova O.G., Maltsev D.I., Ilyina A.P., Roshchin A.O., Yamskova V.P., Yamskov I.A.. Peptides of Plant Origin Exerting Hepatoprotective Properties // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. Nova Science Publishers. 2015. V. 9. I. 2. P. 517-529.
14. Мальцев Д.И., Ямскова В.П., Ильина А.П., Березин Б.Б., Ямсков И.А. Биорегулятор из печени крыс // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т.52. №3. С. 1-4. DOI: 10.7868/S055510 9916030119
15. Налобин Д.С., Краснов М.С., Алипкина С.И., Сырчина М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени крысы и сыворотки крови, на состояние печени мыши при роллерном органотипическом культивировании после СС14 индуцированного фиброза // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016. № 2. с. 126-131. DOI:10.1007/s10517-016-3468-1
16. Шайхалиев А.И., Краснов М.С., Ильина А.П., Ямскова О.В., Рыбакова Е.Ю., Свентская Н.В., Белецкий Б.И., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Влияние химической природы имплантационных материалов на протекание регенеративных процессов в костном ложе // Биофизика. 2016. Т. 61. №4. С. 813-822.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ТЕМЕ

При изучении регуляции метаболического и клеточного гомеостаза в онтогенезе животных важную роль играет анализ механизмов, определяющих устойчивость процессов индивидуального развития. В представленном исследовании приведены новые данные о молекулярных и физиологических механизмах устойчивости к воздействию температуры и гипоксии на процессы развития, роли кальциевого гомеостаза и кальциевых каналов, а также нарушениях метаболического гомеостаза при развитии патологических состояний в клетках эндометрия.

Для понимания механизмов клеточного гомеостаза важное значение имеет анализ прямых взаимодействий клеток, определяющих образование и выделение в межклеточную среду специфических сигнальных факторов. Впервые показано дезорганизующее действие на популяцию клеток в культуре нейротрансмиттеров дофамина и глутаминовой кислоты, которые ликвидируют ритм синтеза белка и прекращают межклеточные взаимодействия.

Обнаружен новый класс биорегуляторов, которые представляют собой пептидно-белковые комплексы, выделенные из межклеточного пространства тканей животных, растений и грибов. В сверхмалых дозах эти соединения оказывают влияние на основные биологические процессы, проявляют способность стимулировать восстановление и репарацию в патологически измененных тканях.

Отчет утвержден решением Ученого совета ИБР РАН, «27» декабря 2016 г., Протокол № 14