

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

УДК 612.64

№ ИНГЗ 0108-2016-0004

№ НИОКТР АААА-А16-116120810089-9

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН

Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев



27 декабря 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.


  
27.12.17  
подпись, дата

Н.Д. Озернюк

Москва, 2017

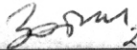
## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, Доктор  
биологических наук, профессор

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

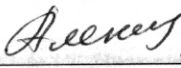
Н.Д. Озернюк (введение, раздел 2  
заключение)

Ведущие исполнители темы:  
Доктор биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

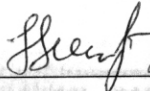
А.А. Зотин (раздел 1)

Кандидат биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

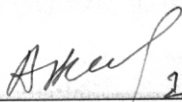
Т.А. Алексеева (раздел 2)

Кандидат биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

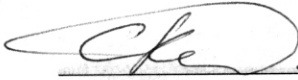
М.В. Нечаева (раздел 2)

Кандидат биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

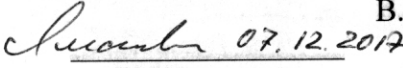
А.М. Красный (раздел 3)

Кандидат биол. наук

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
27.12.2017

С.Ю. Клейменов (раздел 4)

Доктор биол. наук, профессор

  
\_\_\_\_\_  
подпись, дата  
07.12.2017

В.П. Ямскова (раздел 5)

**Механизмы регуляции метаболического и клеточного гомеостаза в индивидуальном развитии»**

**СОДЕРЖАНИЕ**

<b>Реферат</b>	<b>4</b>
<b>Введение</b>	<b>5</b>
<b>Раздел 1.</b> Динамика энергетического метаболизма и роста в онтогенезе животных и механизмы метаболического гомеостаза	<b>6</b>
<b>Раздел 2.</b> Влияние факторов внешней среды (гипоксии и температуры) на энергетический метаболизм и некоторые физиологические параметры развивающихся животных. Поиск антигипоксических средств	<b>9</b>
<b>Раздел 3.</b> Метаболические нарушения в эндометрии и при преэклампсии в процессе внутриутробного развития	<b>15</b>
<b>Раздел 4.</b> Исследование структурной и ферментной термостабильности биомолекул	<b>26</b>
<b>Раздел 5.</b> Исследование регуляторных белков, выделенных из тканей млекопитающих: биорегуляторы органного и тканевого гомеостаза, биологически активные вещества в сверхмалых дозах	<b>29</b>
<b>Публикации по теме</b>	<b>31</b>

## РЕФЕРАТ

Отчет 32 с., 5 разделов, 10 рис., 2 табл., 14 цитирований, публикаций по теме 8.

Исследованы рост и морфогенез глохидиев пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* на жабрах атлантического лосося *Salmo salar* в р. Сюскюяййоки (Карелия). Исследован энергетический обмен у роговой катушки *Planorbarius corneus* в зародышевом развитии.

Проведено сравнение эффектов острой гипоксии на двигательную активность куриного зародыша на разных стадиях развития и оценены возрастные изменения этого ответа. Исследована скорость и интенсивность потребления кислорода в постличиночный период развития иглистого тритона – наименее изученного периода онтогенеза этого вида хвостатых амфибий.

На основании результатов данной работы, сделано предположение, что причиной развития ПЭ может быть разрушение эндотелия материнских сосудов и клеток трофобласта плаценты при повышенной активности провоспалительных макрофагов.

С помощью тестовой системы, основанной на тепловой агрегации BSA было показано, что анализ указанной зависимости может доказать существование стадию агрегат-агрегатного взаимодействия в общем процессе агрегации, который становится более заметным в присутствии аргинина и его производных.

Показано выраженное противовоспалительное действие биорегулятора, выделенного из сыворотки крупного рогатого скота, на ткани желудка и двенадцатиперстной кишки у крыс *in vivo* в эксперименте. Показано протекторное действие биорегулятора, выделенного из склеры глаза, на состояние тканей склеры, пигментного эпителия и хороида при органотипическом культивировании тканей заднего сектора глаза *in vitro*. При органотипическом культивировании ткани яичника крысы *in vitro* показано, что биорегулятор, выделенный из яичников коров, обеспечивает увеличение жизнеспособности фолликулов (особенно, вторичных) в яичнике млекопитающих.

Ключевые слова - пресноводная жемчужница, атлантический лосось, роговая катушка *Planorbarius corneus*, зародышевое развитие, острая гипоксия, агрегация макромолекул, биорегуляторы.

## Введение

Анализ процессов гомеостаза на метаболическом, клеточном и физиологическом уровнях в онтогенезе представляет существенный интерес, поскольку дает возможность понять закономерности индивидуального развития и механизмы адаптации к факторам окружающей среды.

Исследования динамики энергетического метаболизма (скорости потребления кислорода, темпов роста и уровня двигательной активности) и влияние факторов среды (прежде всего, гипоксии) на эту динамику у различных беспозвоночных и позвоночных животных, позволяет выявить оптимальные условия (траектории), при которых индивидуальное развитие этих организмов протекает в оптимальном режиме (Разделы 1, 2).

Изучение проблем гомеостаза и его нарушений проводится также на примере нарушений внутриутробного развития человека при преэклампсии, когда причиной нарушений является эндотелий сосудов и клеткитрофобласта при повышенной активности макрофагов. В данном случае существенное значение имеет разработка методов диагностики нарушений развития на клеточном и метаболическом уровнях (Раздел 3)

Важным фактором нарушения стабильности внутриклеточных белков является агрегация этих макромолекул *in vivo*, которая наблюдается при болезни Альцгеймера, катаракте и других патологиях. Перспективным представляется исследование проблемы агрегации белков на модельных системах, в частности, на бычьем сывороточном альбумине в присутствии химических шаперонов – аминокислоты аргинина и ее производных, которые эффективно подавляют агрегацию белков (раздел 4).

Перспективными регуляторами органного и тканевого гомеостаза служат применяемые в малых дозах биологически активные вещества, выделяемые из межклеточного пространства тканей млекопитающих. Эти регуляторы вызывают коррекцию ряда патологических нарушений, развивающихся в различных тканях и органах млекопитающих. Проводится анализ химической структуры этих биорегуляторов, что позволит понять механизмы их воздействия на клеточном и тканевом уровнях (Раздел. 5).

Применение используемых в данном проекте подходов для анализа гомеостатического состояния в ходе индивидуального развития животных и человека имеет существенное значение для анализа фундаментальных проблем онтогенеза.

## **Раздел 1. Динамика энергетического метаболизма и роста в онтогенезе животных и механизмы метаболического гомеостаза**

1. Методом неполного паразитологического вскрытия было исследовано 36 экз. разновозрастной молоди пресноводного лосося. Зараженность молоди исследовали в конце октября–начале ноября, когда температура воды снижалась до 1–3°C. Рыбу отлавливали с помощью электролова. У отловленных рыб подсчитывали общее число глохидиев на жабрах. Для количественной характеристики зараженности рыб использовали стандартные показатели: встречаемость паразитов, средняя интенсивность заражения, индекс обилия паразитов. Статистический анализ показателей зараженности и распределения численности паразитов проводили с использованием программы QuantitativeParasitology (QP). Гистоморфологический анализ проводили на срезах жабер толщиной 6 мкм, окрашенных гематоксилин-эозином (рис.1-1). Измеряли следующие параметры глохидиев: диаметр глохидия; диаметр окружности, площадь которой равна площади эллипса, длинная ось которого равна наибольшему промеру глохидия, короткая – наименьшему; удлиненность глохидия, характеризующую морфогенез – соотношение наибольшего и наименьшего промеров глохидия; диаметр цисты (вычисляется аналогично диаметру глохидия); толщину стенки цисты – половину разницы между диаметрами цисты и глохидия; удлиненность цисты, которая вычисляется аналогично удлиненности глохидия. Достоверность различий выбранных параметров оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Стадии развития глохидиев определяли по классификации Карна и Миллемана. Проведен сравнительный анализ гистологических особенностей глохидиев в зависимости от возраста цисты и получены результаты о взаимосвязи и влияния сезонных изменений температуры воды на динамику роста и морфогенез глохидиев, что имеет важное значение для адаптации живых организмов и обеспечения устойчивости участников отношений паразит–хозяин.

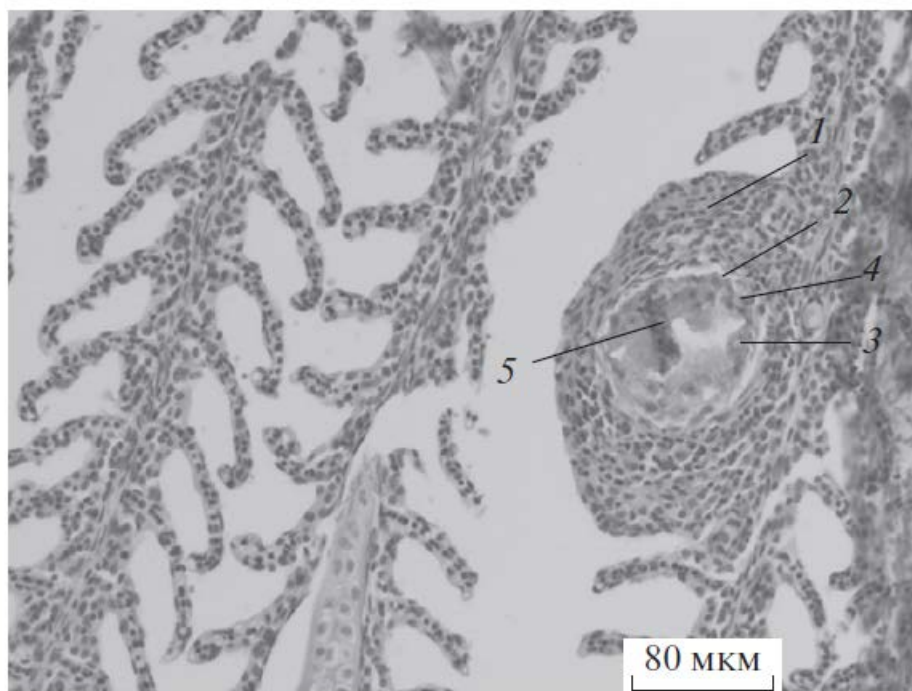
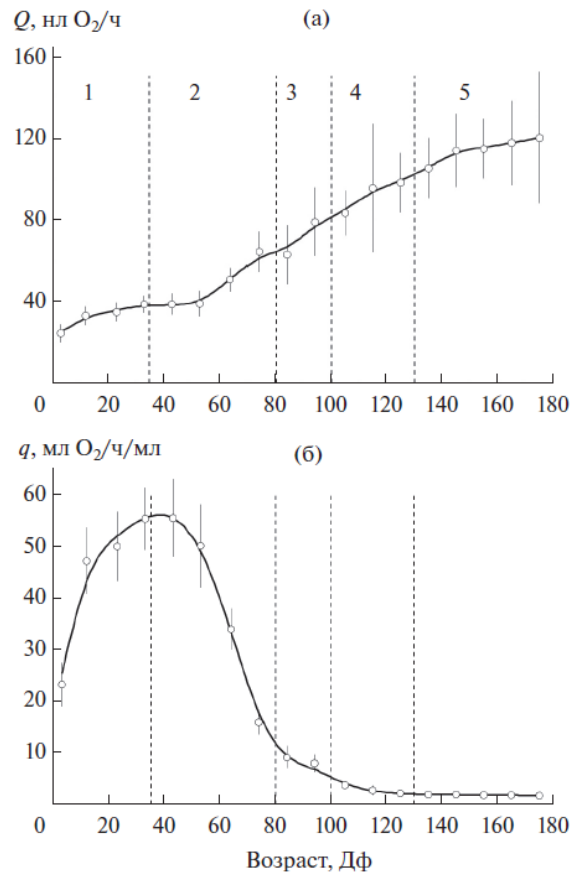


Рис. 1-1. Глохий в цисте на вторичном жаберном лепестке молоди атлантического лосося. 1 – капилляры вторичного жаберного лепестка в составе цисты, 2 – внешняя личиночная мантия, 3 – клетки внутренней личиночной мантии, 4 – бластные клетки, 5 – личиночный аддуктор

2. Проведено исследование изменения энергетического обмена у роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda) в зародышевом развитии.

Кладки *Planorbarius corneus* получали от родительских особей, разводимых в лабораторной аквакультуре. Измерение потребления кислорода кладками проводили с помощью оксиметра OrionStar A223 RDO/DO portableneter (“ThermoFisherScientific”, USA). Для определения размеров зародышей проводили микровидеосъемку кладок с помощью цифровой видеокамеры DCM800 (Micromed, Russia) и программного обеспечения ScopePhotosoftware (version 3.1.386, ScopeTek, China). Размеры зародышей определяли путем измерения их изображений с использованием программы Excel с точностью 1 мкм. Всего исследовано 85 кладок с 881 зародышами. Взаимозависимость скорости потребления кислорода и объема зародышей аппроксимировали степенным (аллометрическим) уравнением:  $Q = aV^k$ , где  $a$  и  $k$  – аллометрические коэффициенты. Показано, что скорость потребления кислорода постоянно увеличивается в процессе эмбриогенеза. Интенсивность дыхания (скорость потребления кислорода на единицу объема зародыша) первоначально повышается, а затем плавно уменьшается вплоть до вылупления моллюсков. На ранних этапах развития вплоть до стадии ранней трохофоры зародыш не растет, и, следовательно, изменение скорости потребления кислорода в этот период не связано с изменением объема зародыша. Снижение интенсивности дыхания начинается одновременно с началом роста

зародыша на стадии средней трохофоры (рис.1-2). Начиная со стадии средней трохофоры и вплоть до вылупления, взаимозависимость между скоростью потребления кислорода и объемом зародыша может быть описана аллометрическим уравнением со степенным коэффициентом равным примерно 0.23.



**Рис. 1-2.** Изменение скорости потребления кислорода(а) и интенсивности дыхания (б) в эмбриогенезе *P. corneus*. По оси абсцисс – биологическое время Делтаф. Кружки – средние значения; планка погрешностей – стандартная ошибка среднего; линии –сглаживание кубическими сплайнами. Вертикальные пунктирные линии – границы стадий развития. Цифры – стадии развития: 1. дробление, бластула и гастрюла, 2. трохофора, 3. велигер, 4. великонха, 5. зародыш, прошедший метаморфоз.



## **Раздел 2. Влияние факторов внешней среды (гипоксии и температуры) на энергетический метаболизм и некоторые физиологические параметры развивающихся животных. Поиск антигипоксических средств.**

### **2.1. Влияние гипоксии на эмбриональную моторику**

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Продолжая исследования влияния гипоксии на эмбриональную моторику куриного зародыша в процессе развития, мы сравнили эффекты острой гипоксии разного уровня (10 и 5% O<sub>2</sub>) и разной длительности (20 и 40 мин). Куриный зародыш широко используется в качестве модельного объекта при исследовании пренатальной гипоксии. В настоящее время пренатальная гипоксия исследуется интенсивно и проводится поиск способов ее коррекции.

Изучению двигательной активности в эмбриогенезе в настоящее время уделяется большое внимание, поскольку она существенно влияет на развитие опорно-двигательной системы и на формирование нервных связей при эмбриональном развитии. Однако каким образом изменяется эмбриональная моторика при гипоксическом воздействии разного уровня и как эффект зависит от стадии эмбрионального развития остается полностью не изученным. Исходя из этого, задачей наших исследований было сравнить эффекты острой гипоксии на двигательную активность куриного зародыша на разных стадиях развития и оценить возрастные изменения этого ответа.

#### **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 (DMK 23UV024, Германия) закрепленной к микроскопу ОПТИКА SZM-2Led (Italy) (Рис.2-1.)

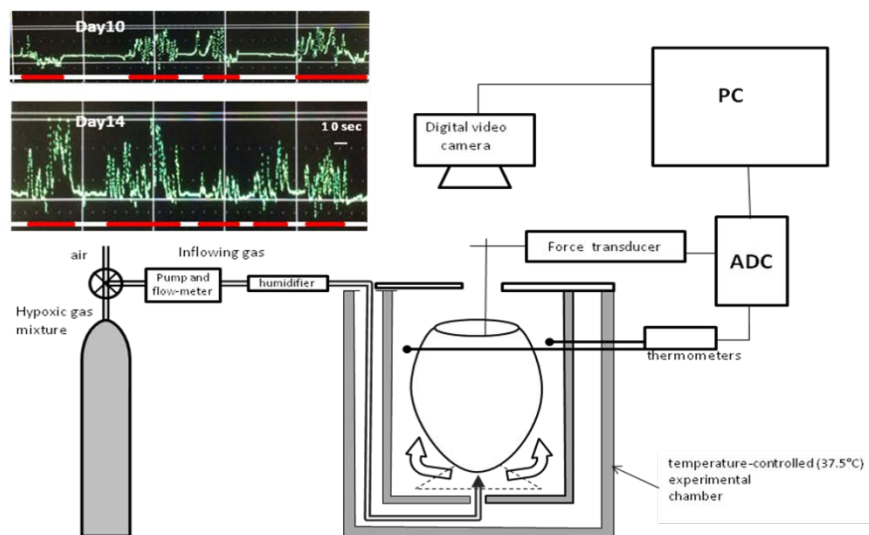


Рис.2-1. Схема установки (Nechaeva, Alexeeva 2017).

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 10% O<sub>2</sub> и 90% N<sub>2</sub> или 5% O<sub>2</sub> и 95% N<sub>2</sub>. 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).

Результаты исследований показали, что ответ циклической активности куриного зародыша на острую гипоксию изменяется с возрастом и зависит от стадии развития. При этом динамика изменения гипоксического ответа с возрастом отличается при средней (10%) и жесткой (5%)

гипоксии. Так при 10% гипоксии, наиболее сильный эффект наблюдали на 15 сут инкубации, а при гипоксии 5% наиболее сильный эффект наблюдался на 12 сут инкубации. Гипоксия 5% вызывала более сильный эффект, чем гипоксия 10% на всех исследованных стадиях эмбриогенеза, кроме 15 сут, когда оба уровня гипоксии вызывали сходный эффект (Рис. 2).

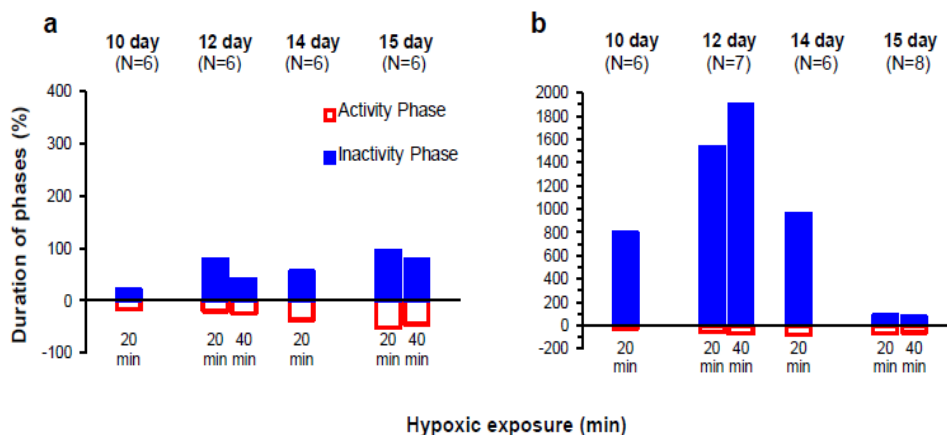


Рис. 2-2. Сравнение изменения активной фазы (пустые стилики) и неактивной фазы (заполненные столбики) моторики куриного зародыша во время острой гипоксии 10%O<sub>2</sub> (а) и 5%O<sub>2</sub> (б) за 20 мин и 40 мин. Величины представлены как процент от величины, полученной при нормоксии перед гипоксией (контроль) на 10, 12, 14 и 15 сут инкубации. В скобках указано число эмбрионов, исследованных на каждой стадии развития. (Nechaeva, Alexeeva, 2017)

Мы полагаем, что наблюдаемый гипоксический ответ циклической моторики на разных стадиях эмбрионального развития определяется двумя факторами: 1) силой гипоксического воздействия и 2) способностью зародыша на разных стадиях развития поддерживать циклическую моторику при снижении концентрации кислорода. Соотношение этих двух факторов определяет уровень снижения эмбриональной моторики при гипоксии на определенной стадии развития. До сих пор не ясно, какие регулирующий механизмы эмбриональной моторики включены в гипоксический ответ. Однако наши исследования параметров циклической активности при гипоксии показали, что в период развития 10-15 сут инкубации формируется способность эмбриона поддерживать моторику при гипоксии. Эта способность увеличивалась с возрастом, и мы это связываем с созреванием механизмов регуляции. Так было показано, что на 12 сут циклическая моторика частично восстанавливалась при гипоксии 10%, но уровень созревания регулирующих механизмов был недостаточным, чтобы ее поддерживать при гипоксии 5%, при которой наблюдалось прекращение движений. К 15 сут способность поддерживать моторику при гипоксии достигло такого уровня, при котором зародыш способен поддерживать моторику при обоих уровнях гипоксии (10% и 5%). Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить

какие регуляторные механизмы участвуют в поддержании моторики зародыша при гипоксии в процессе эмбрионального развития.

2.2. Изучение динамики основных параметров энергетического метаболизма (скорости потребления кислорода и роста массы тела) во время индивидуального развития животных

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение динамики основных параметров энергетического метаболизма (скорости потребления кислорода и роста массы тела) во время индивидуального развития животных имеет существенное значение для понимания механизмов онтогенетических процессов. Эмбриогенез, постэмбриональное развитие и последующие этапы онтогенеза протекают в природе в разных условиях среды, прежде всего, температурных и кислородных, и развивающийся организм адаптируется к изменяющимся условиям развития.

Уровень потребления кислорода значительно изменяется на разных этапах индивидуального развития, что связано с формированием аппарата энергообеспечения на ранних стадиях онтогенеза (эмбриогенез и личиночное развитие). В этот период меняется характер потребления кислорода из окружающей среды. Неспецифическое потребление кислорода путем его диффузии через клеточные мембраны зародышей водных животных, а впоследствии диффузия в кровеносные сосуды желточного мешка сменяется при появлении жаберного аппарата на более эффективный специализированный тип дыхания. Расчет скорости потребления кислорода на единицу массы тела растущего животного дает возможность сравнения этого показателя энергетического метаболизма (интенсивности потребления кислорода) на разных стадиях индивидуального развития различных видов животных (Wieser, 1984; Озернюк, 1885, 1992, 2000; Озернюк, Лелянова, 1985; Владимирова и др., 2000; Владимирова и др., 2003, 2010, 2012). Зависимость скорости потребления кислорода от массы тела, имеющая нелинейный характер, аппроксимируется уравнением типа

$$Q_{O_2} = aM^k, \quad (1)$$

где  $Q_{O_2}$  – скорость потребления кислорода,  $M$  – масса тела,  $a$  и  $k$  коэффициенты.

Целью данного исследования было изучение скорости и интенсивности потребления кислорода в постличиночный период развития иглистого тритона – наименее изученного периода онтогенеза этого вида хвостатых амфибий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на иглистом тритоне *Pleurodeles waltl*. (отр. Caudata, сем. Salamandridae). В экспериментах были использованы животные в возрасте 1 мес. после метаморфоза и более поздние стадии развития (в течение 3.5 года после метаморфоза). Тритонов содержали при температуре 16-20°C. Все манипуляции с животными в лабораторных условиях проводили в соответствии с требованиями Комитета по этике исследований животных ИБР РАН.

Потребление кислорода измеряли манометрическим методом Варбурга в течение 2-3 час. Измерения проводили при оптимальной для данного вида тритонов температуре, равной 18°C. Рассчитывали скорость потребления кислорода (мл/ч) и интенсивность потребления кислорода (мл/ч/г). Связь между потреблением кислорода и массой тела выражали аллометрическим уравнением (1). Коэффициенты  $a$  и  $k$  рассчитывались с помощью MatLab (Matwork) без логарифмирования исходных данных с применением алгоритма оптимизации Левенберга-Марквардта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость потребления кислорода увеличивается в течение первых 1.5 года после метаморфоза и на более поздних этапах роста животных практически не меняется. В течение первого года роста скорость потребления кислорода самцами и самками не отличается. Однако самки в возрасте 2-2.5 года потребляют кислород в 1.7 раза больше по сравнению с самцами.

Интенсивность потребления кислорода, в отличие от периода эмбрионального развития, снижается во время роста тритонов; к периоду полового созревания этот показатель в 1.7 раза ниже по сравнению с неполовозрелыми животными после окончания метаморфоза. В последующие месяцы этот показатель энергетического метаболизма продолжает снижаться, а затем в течение двух лет не меняется, составляя примерно  $0.034 \pm 0.003$  мл/ч/г. Зависимость уровня потребления кислорода от массы тела животных имеет нелинейный характер. Аллометрическое уравнение, аппроксимирующее все полученные данные, имеет следующий вид

$$QO_2 = 0.1 \pm 0.02 M^{0.68 \pm 0.05} (R^2 = 0.85, n = 199), \quad (2)$$

где  $QO_2$  – скорость потребления кислорода, мл/ч,  $M$  – масса, г;  $R^2$  – коэффициент корреляции,  $n$  = число измерений.

Интенсивность потребления кислорода на протяжении всего исследованного периода развития тритонов одинакова у самок и самцов.

Представленные в данной работе результаты, а также полученные нами ранее результаты для других стадий развития тритона (Владимирова и др., 2010, 2012), свидетельствуют о том, что динамика интенсивности потребления кислорода на этих этапах онтогенеза определяется соотношением темпов прироста скорости потребления кислорода и массы тела этих животных. В итоге интенсивность потребления кислорода возрастает в период эмбриогенеза, достигая максимального значения примерно к 15 сут развития, и постепенно снижается на последующих этапах онтогенеза, а после 80 сут развития остается на постоянном уровне. Это означает, на ранних стадиях развития прирост скорости потребления кислорода превышает темп прироста массы тела животных, а на более поздних этапах роста имеет место обратная ситуация; на последующих стадиях динамика скорости потребления кислорода и роста тритонов практически одинаковая.

Представленная динамика интенсивности потребления кислорода в онтогенезе близка к результатам, полученным на других видах рыб (Озернюк, 1985, 2000; Озернюк Лелянова, 1985) и амфибий (Владимирова и др., 1985).

### **Раздел 3. Метаболические нарушения в эндометрии и при преэклампсии в процессе внутриутробного развития**

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Преэклампсия (ПЭ) - это гестационное многофакторное заболевание неясной этиологии, в основе которого лежит гипертензия в сочетании с протеинурией и/или дисфункцией жизненно важных органов. Одна из концепций развития ПЭ предполагает формирование недостаточной иммунной толерантности к полуалогенному плоду (или полностью аллогенному в случае донации яйцеклетки) [1]. Также, как возможную причину ПЭ, рассматривают недостаточный уровень адаптации тканей и органов к изменениям в организме происходящих во время беременности. Одним из таких изменений является значительное увеличение активных форм кислорода (АФК) в крови у беременных женщин. Ранее мы установили, что к третьему триместру беременности уровень АФК в крови повышается примерно в 2-3 раза как у женщин с физиологически протекающей беременностью, так и у женщин с ПЭ [2]. Однако уровень АФК в случае с ПЭ был взаимосвязан с уровнем протеинурии. У женщин с ПЭ отмечаются повышенные уровни маркеров повреждения эндотелиальных клеток - фибронектина и фактора фон Виллебранда [3]. Предполагается, что существует связь между отклонениями в инвазии трофобласта плаценты и материнской эндотелиальной дисфункцией, возникающей за счет высвобождения плацентарных факторов в кровь матери [4, 5]. Однако полного понимания причин возникновения материнской эндотелиальной дисфункции на данный момент нет. Данная работа направлена на решение двух задач. Первая - выявить факторы, имеющие наиболее значимые различия при развившейся ПЭ, для дальнейшего их использования в динамических исследованиях. Вторая - поиск взаимосвязей между про- и противовоспалительными цитокинами, а также общей внеклеточной ДНК (овДНК) и плодовой внеклеточной ДНК (пвДНК) в плазме крови матери при ПЭ для выявления возможных причин и механизмов развития ПЭ.

#### **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Было собрано 19 образцов плазмы от женщин с ПЭ (из них 15 с умеренной и 4 с тяжелой ПЭ), и 18 образцов плазмы от женщин, контрольной группы, в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздрава РФ. Исследование было одобрено этическим комитетом, всеми пациентками было подписано информированное согласие на участие в данном исследовании. Забор периферической крови осуществляли до начала развития родовой деятельности.

Определение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в плазме периферической крови проводили мультиплексным методом с использованием стандартной 8-плексной тест-системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном иммуноанализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью приложения Bio-Plex Manager 6,0 Properties (Bio-Rad, США). Содержание интерлейкинов представлено в пг/мл.

Для количественного определения овДНК и пвДНК было собрано по пять мл периферической крови беременных женщин в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА, и обработаны в течение часа после забора. Плазма была выделена центрифугированием в два этапа при 4 °С: первый - 10 мин, 200 g, второй - 10 мин, 4500 g. Образцы плазмы хранили при температуре -80 °С. В данной работе уровень овДНК был оценен количественным ПЦР-анализом путем определения концентрации промотора гена *RASSF1A*. Оценка уровня пвДНК основана на данных о том, что в геноме плода промотор гена *RASSF1A* гиперметилирован [6], и, соответственно, концентрация его гиперметилированной части в крови матери будет соответствовать количеству геномных единиц пвДНК. овДНК выделяли из 1000 мкл плазмы с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия) согласно рекомендациям изготовителя. Полученную ДНК переосаждали этанолом с соосадителем Satellite Red (Евроген, Россия) с предварительной очисткой хлороформом, далее разводили в 13 мкл воды. 10 мкл раствора ДНК использовали в реакции метилчувствительной рестрикции, для выделения гиперметилированного промотора гена *RASSF1A*. Были использованы ферменты *HhaI* (NEB, England) 30 единиц активности (Е), *HpaII* (NEB, England) 30 Е, *BstUI* (NEB, England) 60 Е. Реакцию рестрикции проводили в два этапа: 2 ч при 37 °С и 6 ч при 60°С. После чего ДНК осаждали этанолом, с предварительным удалением рестриктаз с помощью хлороформа. Полученную ДНК растворяли в 10 мкл воды. 2 мкл полученного раствора использовали в реакции ПЦР для контроля рестрикции с праймерами к гену *ACTB*. В случае отсутствия ответа оставшийся раствор ДНК использовали в реакции ПЦР с праймерами к *RASSF1A*. ПЦР-анализ проводили одновременно с пятью различными концентрациями стандарта ДНК, который изготовили из ДНК, выделенной из крови, с использованием магнитных частиц (Силекс, Россия). Концентрацию стандарта ДНК определили с помощью спектрофотометра (DeNovix, USA). Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 (BioRad, USA). Программа ПЦР: 95 °С - 3 мин, 45 циклов: 95 °С 10 с, 60 °С, 30 с 72 °С. Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 1.



**Таблица 1.** Последовательности праймеров и зондов.

Ген	Последовательность	Праймер/Зонд
<i>RASSF1A</i>	CCGTGGCCACCGCTTCC	Прямой праймер
	CGCACGACGCCCCAGATG	Обратный праймер
	(R6G)GGGCCC GCCACGCACACG(BHQ2)	Зонд
<i>ACTB</i>	GCAAAGGCGAGGCTCTGT	Прямой праймер
	CGTTCGAAAGTTGCTTTTATGG	Обратный праймер
	(FAM)ACCGCCGAGACCGCGTC(MGB)	Зонд
<i>SRY</i>	TGGCGATTAAGTCAAATTCGC	Прямой праймер
	CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT	Обратный праймер
	(FAM)AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA(RTQ1)	Зонд

Для подтверждения валидности метода, используемого для определения концентрации пвДНК, была набрана дополнительная группа – 19 женщин без уточненного диагноза на третьем триместре беременности с мужскими плодами и проведено исследование корреляции концентраций гиперметилированной части промотора *RASSF1A* и *SRY*, гена Y хромосомы в плазме крови. Было установлено, что концентрация *RASSF1A* после обработки рестриктазами коррелирует с концентрацией *SRY* плазме матери ( $r_s = 0.891$ ;  $p < 0,0001$ ; корреляция Спирмена) (рис.1).

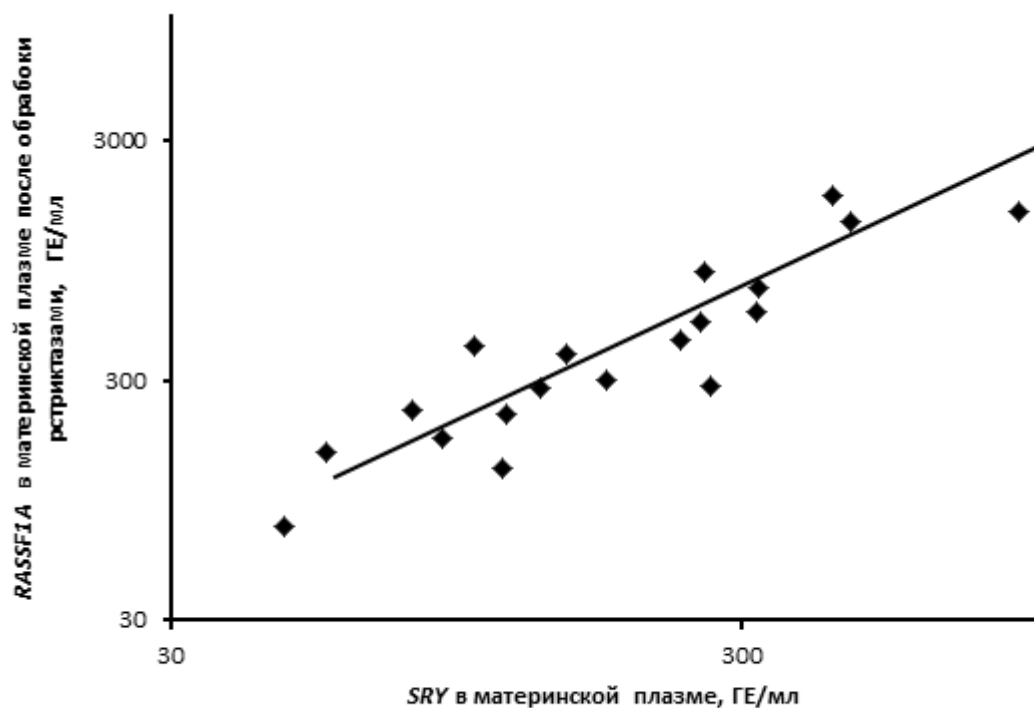


Рис. 3-1. Корреляция концентраций гиперметилированной части промотора RASSF1A и SRY в плазме матери в третьем триместре беременности женщин с мужскими плодами ( $r_s = 0.891$ ;  $p < 0,0001$ ; корреляция Спирмена). Оси в логарифмическом масштабе. Количество fetal cfDNA и SRY в плазме крови женщин указано в геномных единицах на мл (ГЕ/мл).

Анализ значимости различий между группой преэклампсия и контрольной группой проведен с использованием двухстороннего теста Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы (M), 1 и 3 квартилей (25%, 75%). Для изучения взаимосвязи между исследуемыми факторами использовали метод ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в виде коррелограмм. Достоверными различия считались при  $p < 0,05$ . Статистический анализ, построение коррелограмм и графиков выполнены в среде R версии 3.3.3 с использованием библиотек ggplot2, pROC и corrplot (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные клинические характеристики женщин включенных в исследование представлены в таблице 2. Средний возраст в исследуемых группах был примерно одинаковым ( $29 \pm 4.36$  лет для группы Норма и  $30 \pm 4.62$  лет для группы ПЭ). ИМТ в группе ПЭ был выше  $30.27 \pm 6.33$  кг/м<sup>2</sup>, по сравнению с контрольной группой -  $26.24 \pm 3.6$  кг/м<sup>2</sup> ( $p=0.22$ ). Артериальная гипертензия и протеинурия в группе ПЭ (САД- $141.42 \pm 8.64$  и ДАД- $88.57 \pm 5.34$  мм рт.ст; протеинурия- $0.75 \pm 0.93$ г/л) были достоверно выше по сравнению с контрольной группой (САД- $118 \pm 9.2$ , ДАД- $76 \pm 5.72$  мм рт.ст; протеинурия  $<0,3$ г/л). Гестационный возраст на момент родов в группе ПЭ составлял  $35.85 \pm 3.95$  недель, что соответственно отражалось на весе ребенка -  $2627.27 \pm 1011.68$ г, по сравнению  $39.22 \pm 1.32$  недель гестации и  $3352.94 \pm 386.23$ г – вес ребенка в контрольной группе.

**Таблица 2.** Основные клинические характеристики женщин группы норма и преэклампсия.

Параметры	Группа Норма (n=20)	Группа ПЭ (n=20)	p
Средний возраст, лет	$29 \pm 4.36$	$30 \pm 4.62$	0.22
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	$26.24 \pm 3.6$	$30.27 \pm 6.33$	0.02
САДсут, мм рт. ст.	$118 \pm 9.2$	$141.42 \pm 8.64$	0.001
ДАДсут, мм рт. ст.	$76 \pm 5.72$	$88.57 \pm 5.34$	0.001
Протеинурия сут, г/л	Отсутствует/ $<0,3$	$0.75 \pm 0.93$	0.03
Гестационный срок при родоразрешении, нед.	$39.22 \pm 1.32$	$35.85 \pm 3.95$	0.002
Вес ребенка при рождении, г	$3352.94 \pm 386.23$	$2627.27 \pm 1011.68$	0.02

Примечание: Оценка достоверности разницы двух средних показателей проведен с помощью t-критерия Стьюдента, достоверность результатов учитывалась при значении  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где M – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение.

Было проведено сравнение уровней цитокинов, овДНК и пвДНК в плазме крови женщин с ПЭ и контрольной группы (рис. 2). Достоверные различия были обнаружены в уровне fetal cfDNA, total cfDNA, IL-6 и IL-10. В случае ПЭ концентрации пвДНК составила 384 (335; 909) ГЕ/мл, в контрольной группе - 149 (87; 214) ГЕ/мл, ( $p=4*10^{-6}$ ). Концентрация овДНК при ПЭ составила 6701 (4530; 9004) ГЕ/мл, в группе контроля - 1522 (926; 1646) ГЕ/мл ( $p=3*10^{-9}$ ). Исследование цитокинов показало, что при ПЭ достоверно повышено значение уровня IL-6 ( $p=0.046$ ) и IL-10

( $p=0.0046$ ). В случае ПЭ концентрация IL-6 составила 1.13 (0.126; 6.13) пкг/мл, в группе контроля - 0.14 (0.12; 0.94). В случае ПЭ концентрация IL-10 составила 2.09 (0.68; 3.80), группы контроля – 0.26 (0.10; 0.82) пг/мл.

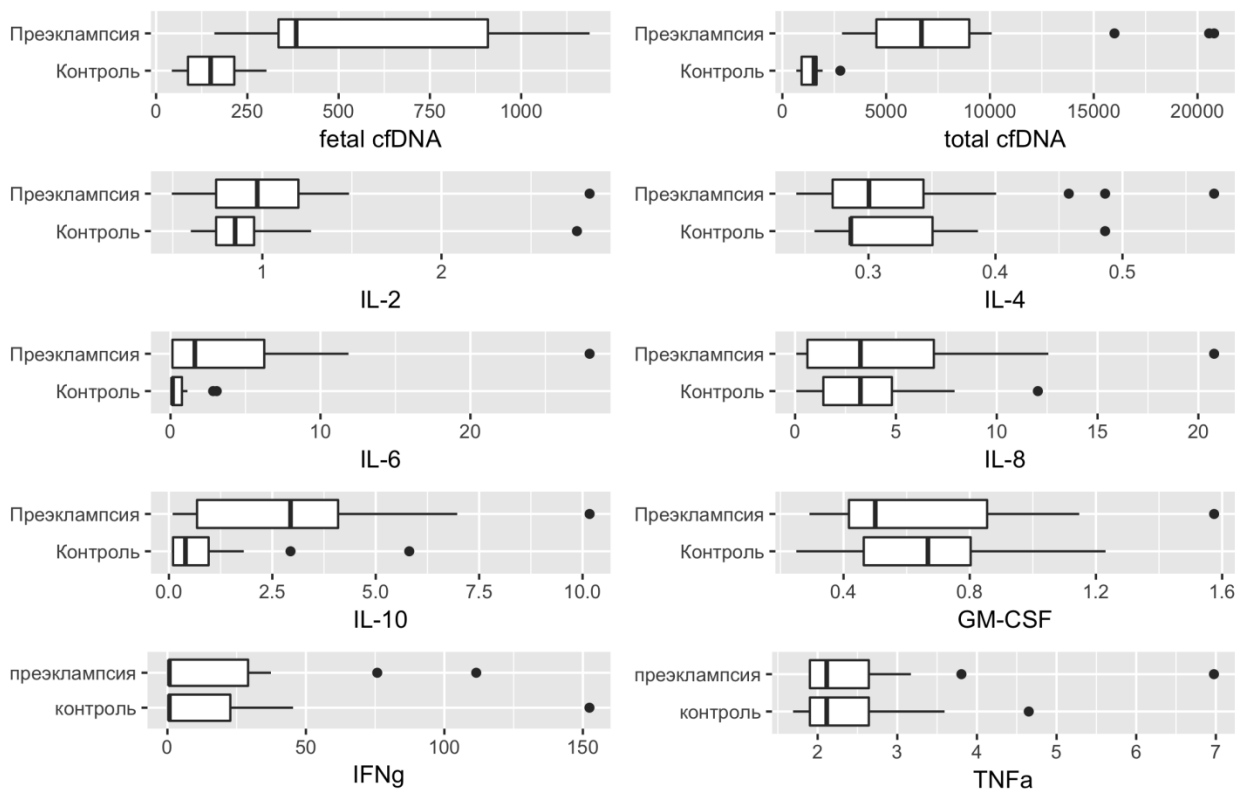


Рис.3-2. Сравнение уровней цитокинов, total cfDNA и fetal cfDNA в плазме крови в группе норма и преэклампсия. Достоверные различия обнаружены в уровне fetal cfDNA, total cfDNA, IL-6 и IL-10. Для IL-2/4/8, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  не обнаружено достоверных различий. Результаты представлены как количество ГЕ/мл для fetal cfDNA и total cfDNA и пг/мл для цитокинов.

Хорошую диагностическую эффективность согласно оценке площади под ROC – кривой показали овДНК и пвДНК. Наиболее точным параметром ПЭ оказался уровень овДНК, при этом AUC=0.924 ДИ 95%(0.83; 1.0), чувствительность составила 89.47%; специфичность - 93.75%, при значении концентрации равным 2873 ГЕ/мл (рис. 3а). Для пвДНК AUC=0.868 ДИ 95%(74.7; 99), чувствительность составила 73.68% специфичность - 87.5%, при значении концентрации равным 277 ГЕ/мл (рис. 3б). Важным наблюдением является то, что у двух женщин с наименьшим значением овДНК из группы ПЭ на фоне антикоагулянтной терапии.

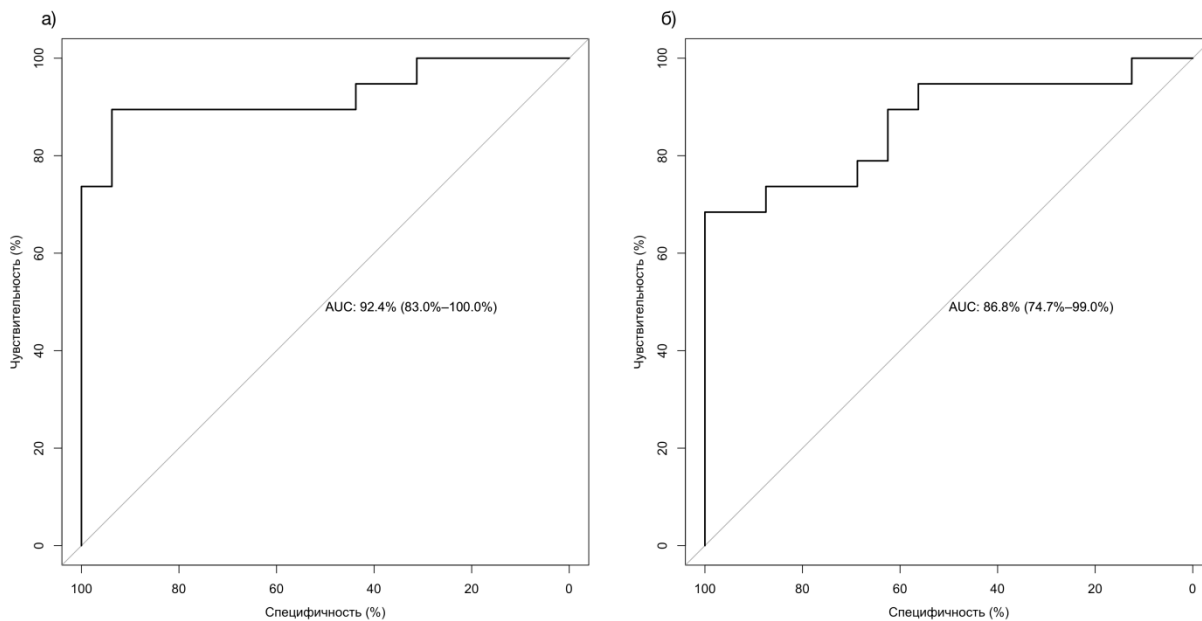


Рис. 3-3. Оценка диагностической эффективности овДНК и пвДНК в плазме крови с помощью ROC кривых. а) Площадь под ROC кривой овДНК составляет 0.924 ДИ 95% (0.83; 1.0), чувствительность 89,47%, специфичность 93,75% при концентрации 2873 ГЕ/мл. б) Площадь под ROC кривой для пвДНК составляет 0,868 ДИ 95% (0,74; 0,99), чувствительность 73.68% %, специфичность 87.5% % при концентрации фетальной ДНК 277ГЕ/мл.

Между уровнем овДНК и пвДНК наблюдалась высокая корреляция как в группе ПЭ ( $p=0.000003$ ), так и контрольной группе ( $p=0.004$ ) (рис.4). Цитокин IL-6 имел высокую корреляцию с TNF $\alpha$  и INF $\gamma$  ( $p<0.0001$ ). Уровень IL-6 и IL-10 имели корреляцию и овДНК и пвДНК ( $p<0.05$ ). В контрольной группе подобных корреляций не наблюдалось.

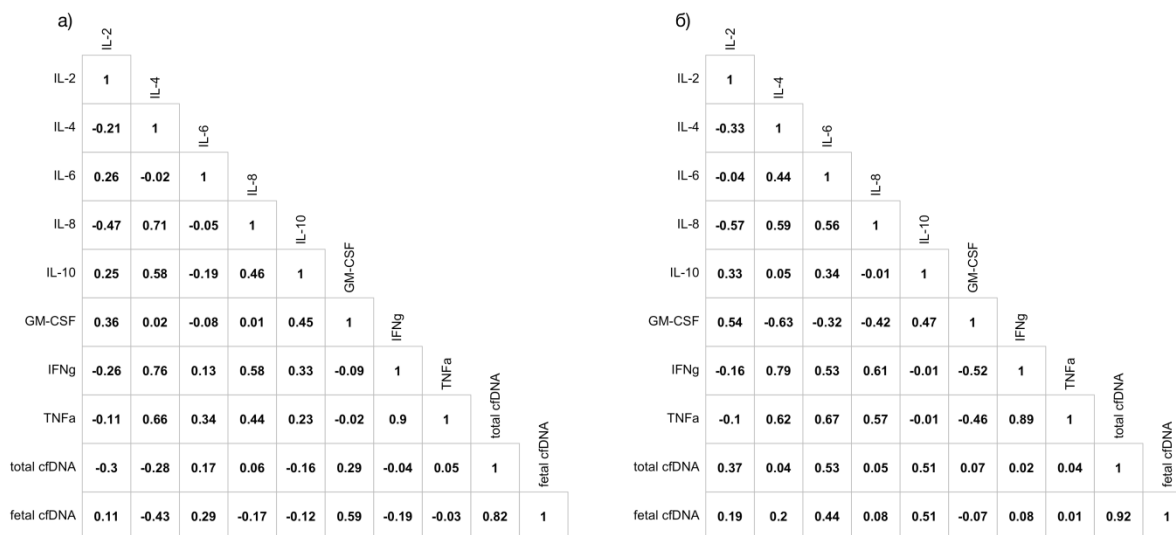


Рис. 3-4. Корреляционные зависимости овДНК и пвДНК и цитокинов между собой в группах контроль и ПЭ. а) В группе норма наблюдается корреляция между овДНК и пвДНК ( $p=0.004$ ). б) В группе ПЭ наблюдается высокая корреляция между уровнем овДНК и пвДНК ( $p=0.000003$ ), IL-6 с TNFa и IFNg ( $p<0.0001$ ), IL-6 и IL-10 с овДНК и пвДНК ( $p<0.05$ ).

Поиск наиболее оптимальных маркеров ПЭ является одной из актуальных задач современного акушерства. ПвДНК рассматривается перспективным прогностическим маркером более 10 лет [7], однако до сих пор не создано тест-системы для определения ПЭ. Некоторые исследователи отмечают методические сложности как главное препятствие широких исследований. В нашей работе мы установили, что более точным диагностическим маркером ПЭ является повышение уровня овДНК по сравнению с уровнем пвДНК в крови матери. Подобные результаты ранее были получены Salvianti et al. [8]. Эти данные указывают на то, что причина развития ПЭ наиболее вероятно находится в кровеносной системе матери, и меньше связана с процессами, протекающими в плаценте. Одним из факторов, в результате которого развивается ПЭ, может быть активация эндотелия сосудов, с последующим его разрушением, что отражается в увеличении уровня овДНК. Chen et al. показали, что уменьшение тяжести ранней формы тяжелой ПЭ может быть связано с переходом эндотелиальных клеток из активированного состояния в нормальное [9]. Не ясно, какие факторы приводят к активации и разрушению эндотелия. Предполагается, что данные факторы высвобождаются из плаценты при недостаточной ее инвазии в матку [4, 5]. Но, возможно, причиной активации и последующего разрушения эндотелия сосудов матери при ПЭ является повышенный в 2-3 раза уровень АФК в крови во время беременности [2], а в случае нормы такой активации не происходит, что связано с адаптацией эндотелия сосудов к окислительному стрессу, происходящей во время беременности.

Мы обнаружили высокий уровень корреляции между пвДНК и овДНК у женщин с ПЭ. Это позволяет предположить, что клетки плаценты, источник пвДНК в крови матери, возможно, разрушаются под воздействием тех же факторов, что и эндотелий материнских сосудов. Отсутствие повышенных значений овДНК у женщин, у которых лечение ПЭ привело к исчезновению симптомов, свидетельствует, о том, что наблюдение за динамикой уровня овДНК в процессе лечения ПЭ может быть прогностическим фактором дальнейшего развития ПЭ.

При исследовании цитокинов мы не обнаружили различий в уровнях IFN $\gamma$  и IL-4 – маркеров активности про- противовоспалительных лимфоцитов Th1 и Th2. При этом уровень IL-10, который в основном продуцируют моноциты [10] был достоверно повышен в группе ПЭ. Это также подтверждается данными других исследований [11]. Считается, что IL-10 обладает противовоспалительным эффектом, об этом может свидетельствовать его корреляция с IL-4 в контрольной группе. Однако в случае ПЭ наблюдается корреляция IL-10 и GM-CSF, фактора способного поляризовать макрофаги в сторону провоспалительного M1-фенотипа. Известно, что в момент апоптоза макрофаги выделяют значительное количество IL-10 [12]. При этом апоптоз макрофагов может быть непосредственно связан с внеклеточной ДНК. Choi et al. установили, что без макрофагов некротические или апоптотические клетки практически не высвобождают внеклеточную ДНК. Однако при взаимодействии с некротическими или апоптотическими клетками макрофаги сами могут подвергаться апоптозу, что, может является причиной появления вДНК [13]. Обнаруженная нами корреляция уровня IL-10 как с пвДНК, так и с овДНК при ПЭ указывает на возможную роль макрофагов в разрушении и эндотелия сосудов, и клеток трофобласта плаценты. Известно, что уровень IL-10 снижается в процессе беременности примерно в три раза [11], что возможно связано с возникновением иммунной толерантности к плоду, выраженной в снижении способности макрофагов к апоптозу. Таким образом, повышенный уровень IL-10 при ПЭ может отражать формирование недостаточной иммунной толерантности. Полученные нами результаты, о том, что IL-6 повышен при ПЭ, также подтверждаются другими исследователями [14]. Высокая корреляция IL-6 и IFN $\gamma$ , фактора поляризующего макрофаги в сторону M1-фенотипа, а также TNF $\alpha$ , фактора продуцируемого макрофагами M1-фенотипа, указывает на связь IL-6 и активности провоспалительных макрофагов. IL-6, как и IL-10, коррелировал и с уровнем овДНК и с уровнем пвДНК. В контрольной группе подобных корреляций не наблюдалось.

Таким образом, на основании данной работы, можно сделать предположение, что причиной развития ПЭ может быть разрушение эндотелия материнских сосудов и клеток трофобласта плаценты при повышенной активности провоспалительных макрофагов. Так как хорошую диагностическую эффективность согласно оценке площади под ROC – кривой показали овДНК и

пвДНК необходимо исследовать возможность их использования, как предикторов ПЭ на ранних сроках беременности.

#### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gleicher, N., Kushnir, V.A., Barad, D.H. (2017) Redirecting reproductive immunology research toward pregnancy as a period of temporary immune tolerance, *J Assist Reprod Genet.*, **34**, 425-430.
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. (2016) Окислительный стресс при преэклампсии и при нормальной беременности, *Акушерство и гинекология*, **5**, 90-95.
3. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. (1991) Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia, *Am J Hypertens.*, **4(8)**, 700-708.
4. Redman C.W., Sargent I.L. (2003) Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review, *Placenta*, **24 Suppl A**, S21-S27.
5. Powe C.E., Levine R.J., Karumanchi S.A. (2011) Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease, *Circulation*, **123(24)**, 2856-2869.
6. Chan K.C., Ding C., Gerovassili A., Yeung S.W., Chiu R.W., Leung T.N., Lau T.K., Chim S.S., Chung G.T., Nicolaidis K.H., Lo Y.M. (2006) Hypermethylated *RASSF1A* in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis, *Clin Chem.*, **52(12)**, 2211-2218.
7. Грачева М.И., Кан Н.Е., Красный А.М. (2016) Роль внеклеточной фетальной ДНК в ранней диагностике осложнений беременности, *Акушерство и гинекология*, **10**, 5-10.
8. Salvianti F., Inversetti A., Smid M., Valsecchi L., Candiani M., Pazzagli M., Cremonesi L., Ferrari M., Pinzani P, Galbiati S. (2015) Prospective evaluation of *RASSF1A* cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia, *Placenta*, **36(9)**, 996-1001.
9. Chen Q., Sousa J.D., Snowise S., Chamley L., Stone P. (2016) Reduction in the severity of early onset severe preeclampsia during gestation may be associated with changes in endothelial cell activation: A pathological case report, *Hypertens Pregnancy*, **35(1)**, 32-41.
10. Pilette C., Detry B., Guisset A., Gabriels J., Sibille Y. (2010) Induction of interleukin-10 expression through Fc $\alpha$  receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase, *Immunol Cell Biol.*, **88(4)**, 486-493.
11. Szarka A., Rigó J. Jr., Lázár L., Beko G., Molvarec A. (2010) Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array, *BMC Immunol.*, **11**, 59-68.



12. Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J.(2002) Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes, *Eur J Immunol.*, **32(7)**, 2011-20.
13. Choi J. J., Reich C. F., Pisetsky D. S. (2005) The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells, *Immunology.* **115(1)**, 55-62.
14. Wang Y., Lewis D.F., Gu Y., Zhao S., Groome L.J. (2011) Elevated maternal soluble Gp130 and IL-6 levels and reduced Gp130 and SOCS-3 expressions in women complicated with preeclampsia, *Hypertension.* **57(2)**, 336-342.

## Раздел 4. Исследование структурной и ферментной термостабильности биомолекул

### ВВЕДЕНИЕ

Агрегация белков *in vivo* является значительным повреждающим внутриклеточным фактором, вызывающим многие патологии человека. Болезнь Альцгеймера проявляется на внутриклеточном уровне в виде накопления амилоидных агрегатов или бляшек. Причиной другой патологии — катаракты также является агрегация белка хрусталика глаза — кристаллина. Белковые агрегаты также встречаются в клетках после сильного стрессорного воздействия. Приведённые примеры показывают актуальность исследования процесса агрегации белков. Изучение динамики агрегации в разных условиях и в присутствии антиагрегационных агентов формирует основу для разработки методов её предотвращения или снижения тяжести патологического состояния, вызванного агрегацией белков, *in vivo*.

Выбор адекватного модельного объекта для подобных исследований и изучение его свойств обеспечивает достоверность трактовок полученных результатов и применимость их на практике.

В 2017 году были продолжены исследования динамики агрегации на модельной системе, представленной бычьим сывороточным альбумином в присутствии химических шаперонов — аминокислоты аргинин и его производных.

Химические шапероны, включая аргинин, и его производные широко используются для разработки агентов, способных эффективно подавлять агрегацию белков. Для объяснения механизма антиагрегационного действия химических шаперонов, методы, основанные на измерении прироста интенсивности светорассеяния, должны быть дополнены методами прямого измерения доли агрегированного белка ( $\gamma_{agg}$ ). Для этой цели в настоящей работе использован метод проточного фракционирования в поперечном поле (AF4).

Новизна работы заключается в предложенном новом параметре, позволяющем получить адекватную характеристику динамики тепловой агрегации белка.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве модельной системы использовали бычий сывороточный альбумин 99+% чистоты (BSA), L-аргинин моногидрохлорид (Arg), L-аргининамид гидрохлорид (ArgEE) и L-аргининэтиловый эфир гидрохлорид (ArgEE) фирмы Sigma–Aldrich без дополнительной очистки.

Кинетические параметры тепловой агрегации BSA изучали методом проточного фракционирования в поперечном поле (AF4) с многоугольным светорассеянием (MALS), ультрафиолетовым (UV) и рефрактивным (RI) детекторами.

Использована система Eclipse 3 (Wyatt

Technology Corporation, USA), основанная на Agilent HPLC насосе (Agilent Technologies, USA). Применение AF4 для изучения кинетики тепловой агрегации БСА было подробно описано в предыдущих публикациях 21, 35, 49.

Для измерения распределения агрегатов по величине гидродинамического радиуса применяли метод динамического светорассеяния. Измерения проводили при помощи Photocor Complex (Photocor Instruments, Inc., USA) с He-Ne лазером (Coherent, USA, Model 31–2082, 632.8 nm, 10 mW). Результаты обрабатывали при помощи специализированного программного пакета DynaLS (Alango, Israel).

Долю агрегированного белка после нагрева до 70 градусов определяли интегрированием кривой ДСК образца и вычитанием полученного результата из исходного количества белка в образце. Для сканирующей калориметрии использовали дифференциальный сканирующий калориметр ДАСМ 4М (СКБ научного приборостроения, г. Пущино).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе мы изучали влияние аргинина и его производных на кинетику температурной агрегации БСА при 70 °С, используя метод динамического светорассеяния и проточного фракционирования в поперечном поле. Агрегация БСА при этой температуре подчиняется реакции второго порядка, что предполагает агрегацию денатурированных молекул белка как лимитирующую скорость стадию. Было продемонстрировано, что в присутствии аргинина и его производных изменяется характер процесса агрегации БСА. Было показано, что аргинин и его производные вызывают образование более крупных агрегатов при тепловой агрегации БСА.

Вместе с тем, отмечено, что размер гидродинамического радиуса агрегатов BSA зависит от концентрации Arg. Концентрация 200 мМ вызывает увеличение  $R_h$ . Дальнейшее повышение концентрации Arg до 1000 мМ уменьшает гидродинамический радиус BSA меньше той величины, которая наблюдалась в отсутствии шаперонов (рис. 1).

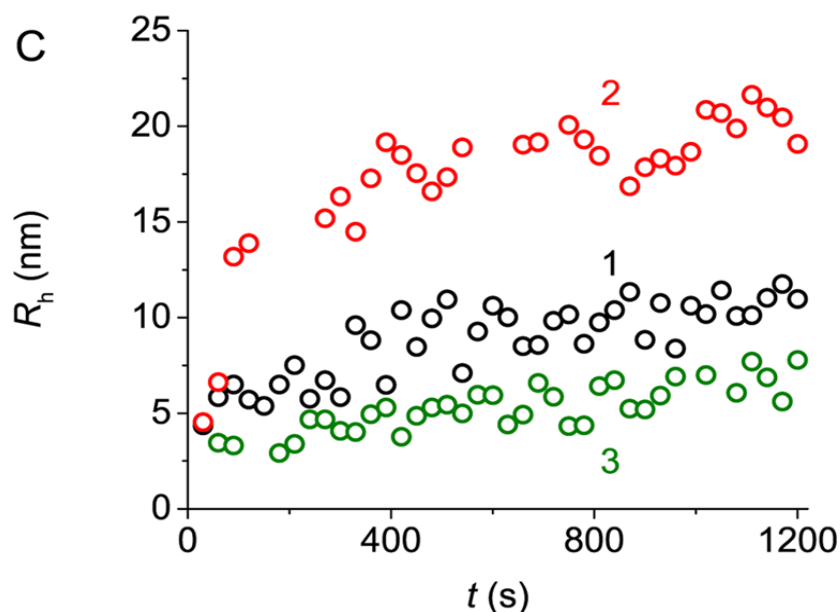


Рис. 4-1. Зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) агрегатов белка от времени, полученная при различных концентрациях Arg: 0 (1), 200 (2) и 1000 мМ (3).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Когда данные о кинетике агрегации получены при помощи DLS, который позволяет определять размер белковых агрегатов, дополняется прямыми измерениями количества агрегировавшего белка, зависимость  $R_h$  от  $\gamma_{agg}$  может обеспечить ценную информацию о характере агрегации белка. Анализ формы этой зависимости позволяет судить о том, остаётся ли процесс агрегации прежним или изменяется под влиянием внешних условий или добавленных химических агентов. С помощью тестовой системы, основанной на тепловой агрегации BSA было показано, что анализ указанной зависимости может доказать существование стадии агрегат-агрегатного взаимодействия в общем процессе агрегации, который становится более заметным в присутствии аргинина и его производных.

По результатам проведённой работы предполагается продолжить изучение действия шаперонов на модельный объект (BSA), имея разработанный в 2017 году метод оценки эффективности шаперон-белкового взаимодействия, позволяющего с большей точностью определять его характер и перспективность.

## Раздел 5. Исследование регуляторных белков, выделенных из тканей млекопитающих: биорегуляторы органного и тканевого гомеостаза, биологически активные вещества в сверхмалых дозах

Изучали биологическое действие нескольких биорегуляторов, выделенных из межклеточного пространства тканей млекопитающих. Биорегуляторы представляют собой гликозилированные,  $Ca^{+2}$ - и липидсодержащие белково-пептидные комплексы, активность которых характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Показано выраженное противоязвенное действие биорегулятора, выделенного из сыворотки крупного рогатого скота, на ткани желудка и двенадцатиперстной кишки у крыс *in vivo* в эксперименте. Показано протекторное действие биорегулятора, выделенного из склеры глаза, на состояние тканей склеры, пигментного эпителия и хороида при органотипическом культивировании тканей заднего сектора глаза *in vitro*. При органотипическом культивировании ткани яичника крысы *in vitro* показано, что биорегулятор, выделенный из яичников коров, обеспечивает увеличение жизнеспособности фолликулов (особенно, вторичных) в яичнике млекопитающих.

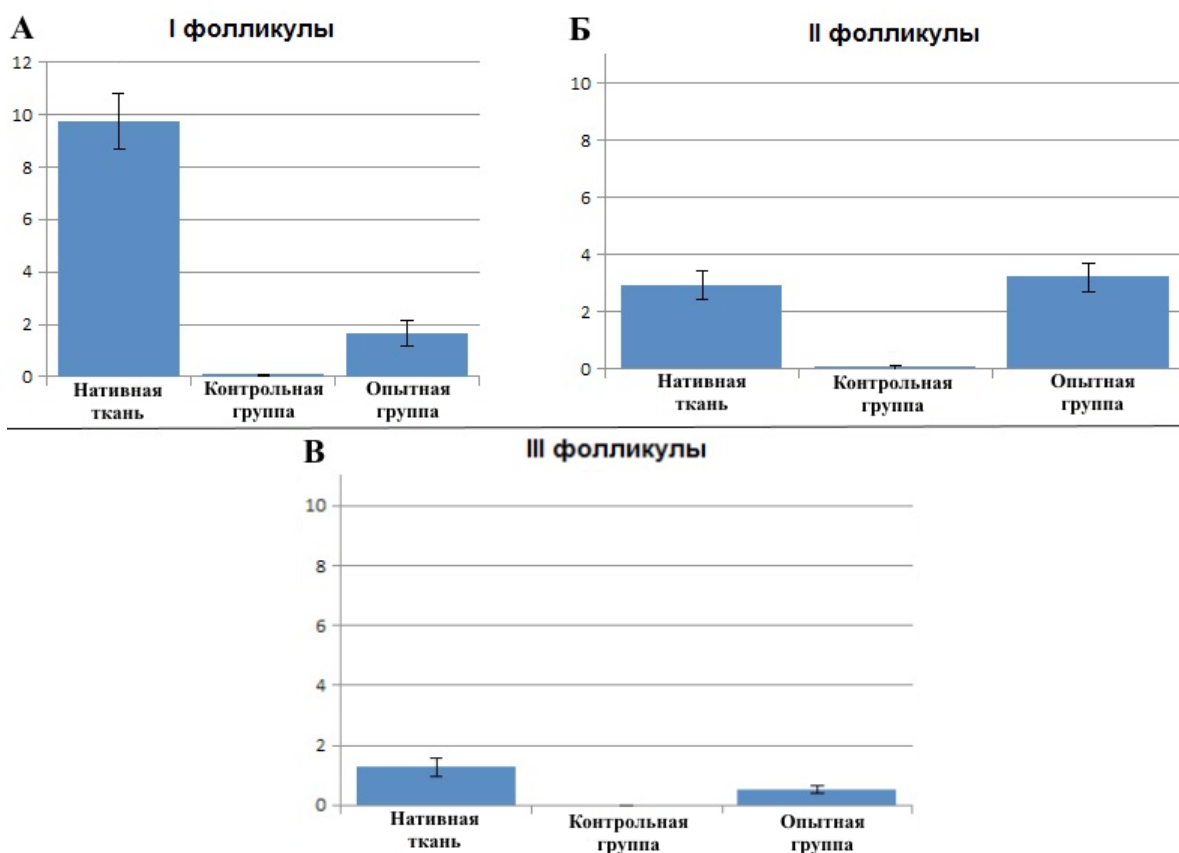


Рис. 5-1 Влияние биорегулятора, выделенного из ткани яичников коров, на жизнеспособность фолликулов яичников крысы при органотипическом роллерном культивировании *in vitro*.

А - первичные фолликулы; Б – вторичные фолликулы; В – третичные фолликулы. По абсциссе – название экспериментальных серий; по ординате – значения экспериментально определяемого параметра, отражающего количество фолликулов в ткани яичника;

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН 06 декабря 2017 г., протокол № 9.

## Публикации по теме

Научные публикации в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of Science:

1. Borzova V.A., Markossian K.A., **Kleymenov S.Y.**, Kurganov B.I. A change in the aggregation pathway of bovine serum albumin in the presence of arginine and its derivatives // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. № 1. DOI: 10.1038/s41598-017-04409-x.
2. Kara D.A., Borzova V.A., Markossian K.A., **Kleymenov S.Y.**, Kurganov B.I. A change in the pathway of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin in the presence of polyamines and arginine // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. V. 104. P. DOI: 889–899. 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.092
3. Mikhaylova VV, Eronina TB, Chebotareva NA, **Kleymenov SY**, Shubin VV, Kurganov BI. A thermal after-effect of UV irradiation of muscle glycogen phosphorylase b. // *PLoS ONE* 2017 V. 12 (12): e0189125. DOI: 10.1371/journal.pone.0189125.
4. **Владимирова И.Г., Алексеева Т.А., Клейменов С.Ю.** Динамика роста массы тела и потребления кислорода в онтогенезе иглистого тритона *Pleurodeles waltl*. 3. Постличиночный период развития // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2017. № 4. С. 370-377. DOI: 10.7868/S0002332917040154 (РИНЦ). (Vladimirova I.G., Alekseeva T.A., Kleymenov S.Y. The dynamics of mass growth and oxygen consumption in ontogenesis of the newt *Pleurodeles waltl*: 3. The postlarval period // *Biology Bulletin*. 2017. V. 44. N 4. P. 372-378. DOI: 10.1134/S106235901704015X.) -
5. **Зотин А.А., Кирик Е.Ф.** Скорость потребления кислорода в зародышевом развитии роговой катушки *Planorbarius corneus* (gastropoda) // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 4. С. 295-300. DOI: 10.7868/S0475145017040097 (РИНЦ). (Zotin A.A., Kirik E.F. Rate of oxygen consumption during embryonic development of great ramshorn *Planorbarius corneus* (Gastropoda) // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2017. V. 48. 4. P. 252-256. DOI: 10.1134/S1062360417040099.
6. **Красный А.М., Волгина Н.Е., Садекова А.А., Щипицына В.С., Сухих Г.Т., Адамян Л.В., Озернюк Н.Д.** Активация  $\alpha 7$ -никотиновых ацетилхолиновых рецепторов вызывает секрецию матриксных металлопротеиназ-9 в эндометрии человека // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2017. № 2. С. 77-80. DOI: 10.7868/S0002332917020072. (РИНЦ). (Krasnyi A.M., Volgina N.E., Sadekova A.A., Shchipitsyna V.S., Sukhikh G.T., Adamyan L.V., Ozernyuk N.D. Activation of  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors causes secretion of matrix metalloproteinases-9 in the human endometrium // *Biology Bulletin*. 2017. Т. 44. № 2. С. 109-112. DOI: 10.1134/S1062359017020078.

7. **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*. 2017. V. 10. P. 10-22. DOI: 10.2174/1874453201710010010.
8. **Nechaeva M., Alekseeva T., Kubasov I.** The heart rate response to moderate and severe acute hypoxia in the 4-day old chicken embryo // *Europ. Poult. Sci.* 2017. 81. P. 35. DOI: 10.1399/eps.2017.204.

#### Статьи и патенты

1. Елистратов П.А., Краснов М.С., Ильина А.П., Ямсков И.А., Ямскова В.П. Белково-пептидный комплекс, повышающий жизнеспособность фолликулов в яичниках млекопитающих // Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение. Регистрационный номер № 2017132536 от 19.09.2017. Заявители: Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН.

#### Тезисы

2. Гимадиева Д.В., Рыбакова Е.Ю., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Изучение ранозаживляющих свойств мембранотропного гомеостатического тканеспецифического биорегулятора сыворотки крови крупного рогатого скота и его отдельных компонентов на модели лоскутной раны кожи мышцы *in vivo* // *Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*. 2017. С. 196-198.
3. Новиков В.И., Мальцев Д.И., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Исследование состава, строения и физико-химических свойств супрамолекулярных структур, выделенных из гриба шиитакэ (*lentinula edodes*) // *Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»*. 2017. С. . 206-208.
4. Богданов В.В., Мальцев Д.И., Куликова О.Г., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Мембранотропные пептиды, выделенные из гепатопанкреаса краба: физико-химические свойства и гепатопротекторная активность. // В сборнике: *Биохимическая физика Труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы*. 2017. С. 44-48.
5. Новиков В.И., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Исследование состава, строения и физико-химических свойств супрамолекулярных структур, выделенных из грибов // В сборнике: *Биохимическая физика Труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы*. 2017. С. 50-55.