

На правах рукописи

Богданов Всеволод Владимирович

**Мембранотропные пептиды, выделенные из морских беспозвоночных и
гриба *Fusarium sambucinum***

03.01.02 биофизика

03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Научные руководители:

Ямсков Игорь Александрович, доктор химических наук, профессор, зав. лабораторией физиологически активных биополимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН;

Ямска Викториа Петровна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;

Официальные оппоненты:

Молочкина Елена Михайловна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Воейков Владимир Леонидович, доктор биологических наук, профессор кафедры биоорганической химии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»

Защита диссертации состоится « »_____ 2017 г. в ___ часов ___ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, Ленинский проспект, д. 38 и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/diss-sovet/razmeshchennye-dissertatsii/189-dissertatsiya-bogdanova-vsevoloda-vladimirovicha>

Автореферат разослан « »_____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.039.01
кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Изучение механизмов, лежащих в основе процессов биорегуляции в живых организмах, является одной из основных проблем современной биологии. Известно, что состояние межклеточных адгезионных взаимодействий в тканях определяет ход и направленность основных биологических процессов. В настоящее время показано, что различные пути регуляторной трансдукции сопряжены с функционированием адгезивных макромолекулярных структур и белков межклеточного пространства. В этом аспекте интерес вызывают мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ), обнаруженные в различных тканях позвоночных животных и растений [1]. Они представляют собой внеклеточно локализованные пептидно-белковые комплексы, которые в растворах образуют крупные наноразмерные частицы [2]. МГТБ влияют на адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток. Важным свойством МГТБ является их способность к стимуляции процессов восстановления и репарации в травмированных и патологически измененных тканях. Биологическая активность биорегуляторов этой группы характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности.

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование мембранотропных пептидов (МП), выделенных из двустворчатых моллюсков – пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* и голубых мидий *Mytilus edulis*. Выбор данных объектов исследования обусловлен интересом к проверке наличия МГТБ-подобных веществ (и, следовательно, опосредованного ими механизма регуляции), у всех типов беспозвоночных животных, а также у колониальных микроорганизмов. Исследование специфической активности также было проведено на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*. Ранее было показано, что ряд МГТБ проявлял ранозаживляющие свойства на данной модели, причем способствуя восстановлению структуры ткани и препятствуя образованию соединительнотканного рубца, чем и был обусловлен интерес к действию исследуемых в работе объектов на данной модели.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования являлся поиск в тканях морских беспозвоночных животных, а также культуральной среде гриба *Fusarium s.* пептидов, проявляющих физико-химические свойства и биологическое действие, сходное с пептидной компонентой мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из тканей позвоночных животных.

Объектами исследования явились гепатопанкреас краба камчатского и двустворчатые моллюски – пресноводная жемчужница *Margaritifera margaritifera* и голубые мидии *Mytilus edulis*, а также культуральная среда гриба *Fusarium s.*

В отдельные **задачи** исследования входило:

- ✓ поиск МП в тканевых экстрактах морских беспозвоночных животных;
- ✓ изучение мембранотропной активности различных фракций, полученных из тканей беспозвоночных животных;
- ✓ изучение физико-химических свойств полученных МП-содержащих фракций;
- ✓ изучение пептидного состава полученных фракций;
- ✓ исследование тканевой специфичности биологического действия биорегуляторов;
- ✓ изучение биологического действия выделенных биорегуляторов на модели заживления экспериментальной кожной раны у мышей *in vitro*.

Научная новизна работы

В настоящем исследовании впервые показано присутствие мембранотропных пептидов, сходных по свойствам с МГТБ, в тканях беспозвоночных животных и микроскопических грибах, что свидетельствует в пользу предположения о существовании опосредуемого данными веществами механизма регуляции во всех живых организмах. Впервые на моделях роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* и CCl_4 -индуцированного фиброза печени крыс *in vivo* было показано тканеспецифическое гепатопротекторное действие данных веществ.

Впервые установлено, что примененная модель роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro* может быть использована в качестве экспресс-методики для исследования гепатопротекторной активности веществ. Кроме того, на данной модели впервые было продемонстрировано гепатопротекторное действие МП, выделенных из тканей беспозвоночных животных, на ткани низшего позвоночного – печень амфибии.

Впервые на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo* показано тканеспецифическое ранозаживляющее действие МП, выделенных из моллюска пресноводной жемчужницы. В этом исследовании впервые продемонстрирована корреляция между способом развития моллюска и проявлением ранозаживляющей активности у выделенных из него МГТБ-подобных веществ.

Практическое значение работы

Морские беспозвоночные животные используются как важное сырье в пищевой промышленности, и, кроме этого, являются ценным источником для получения биологически активных веществ, на основе которых возможна разработка фармакологических препаратов и БАДов. Следует отметить, что биологически активные вещества, присутствующие в тканях беспозвоночных морских организмов, до сих пор остаются малоизученными, а некоторые органы, например, гепатопанкреас краба, являются отходом рыболовного производства. Таким образом, обнаружение новых биологически активных веществ в них может позволить использовать промысловые ресурсы более эффективно.

Для биорегулятора из гепатопанкреаса краба и гриба *Fusarium s.* показано гепатопротекторное действие на ткань печени тритона, что делает его перспективным для создания БАДов и фармакологических препаратов-гепатопротекторов на его основе. Для биорегулятора, выделенного из пресноводной жемчужницы, показано его положительное влияние на заживление экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*, что также делает его перспективным для фармацевтической промышленности.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В тканях беспозвоночных животных и культуральной среде гриба *Fusarium sambucinum* обнаружены пептиды, по своим физико-химическим свойствам и биологическому действию сходные с изученными ранее мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, выделенными из тканей млекопитающих и растений;
2. Выделенные пептиды демонстрируют тканевую специфичность биологического действия на моделях *in vitro* и *in vivo* при отсутствии таксономической специфичности;
3. Изучаемые пептидные фракции оказывают репарирующее действие на ткани на экспериментальных моделях патологий у грызунов *in vivo*.

Личный вклад автора

Выделение исследуемых веществ из тканевых экстрактов, проведение спектральных и хроматографических методов анализа, а также все биологические эксперименты проведены при непосредственном личном участии автора. Постановка задач, экспериментов и обсуждение полученных результатов проводились автором совместно с научными руководителями. Литературный обзор в части, касающейся истории разработки предмета исследования подготовлен автором совместно с научными руководителями, прочий литературный поиск и написание работы проведены автором лично. Материалы диссертации в полном объеме доложены автором в устных

докладах на ряде российских и международных конференций. **Достоверность** полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых физико-химических методов исследования. При проведении данной работы были использованы современные методы исследования белков и пептидов: электрофорез в ПААГ, триптический гидролиз белков, обращенно-фазовая ВЭЖХ, MALDI-TOF масс-спектрометрия, лазерная корреляционная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма и др. Также достоверность результатов обеспечивалась инструментальной и статистической оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены на: X ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 8–10 ноября 2010 г.; II международной конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологий», Казань, 15–18 ноября 2011 г.; XI ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 9-11 ноября 2011 г.; Научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии», Москва, 29 мая 2012 г.; VI Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург, 2–6 июля 2012 г.; 3-м съезде микологов России, Москва, 10–12 октября 2012 г.; III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань, 22–24 ноября 2012 г.; IV международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки», Владикавказ, 17–18 июня 2013 г.; XIII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 28–30 октября 2013; XVI школе-конференции «Актуальные проблемы биологии развития», Москва, 28 октября – 1 ноября 2013 г.; 18-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология XXI века», Пущино, 21–25 апреля 2014 г.; 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология XXI века», Пущино, 20–24 апреля 2015 г.; VII Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине», Санкт-Петербург, 07 - 11 сентября 2015 г.; III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы естественных и математических наук в современных условиях развития страны», Санкт-Петербург, 11 января 2016 г.; 20-ой Международной

Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология XXI века», Пушкино, 18–22 апреля 2016 г.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-00707-а.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии, 6 статей в сборниках научных трудов и 3 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана в классической форме и содержит следующие разделы: введение; обзор литературы по предмету исследования; материалы и методы, использованные в работе; результаты, полученные в работе, и их обсуждение; выводы; список литературы.

Диссертация содержит 134 страницы, 36 рисунков, 11 таблиц, 141 литературную ссылку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения из тканей морских беспозвоночных и культуральной среды гриба *Fusarium s.* биологически активных веществ, сходных по свойствам с МГТБ, был применен разработанный ранее экспериментальный подход, который состоит из: 1) экстракции этих веществ из тканей при определенных условиях; 2) получении фракций, проявляющих характерную для МГТБ мембранотропную активность; 3) исследования физико-химических свойств, характерных для МГТБ; 4) изучения специфической активности на экспериментальных моделях (рисунок 1).

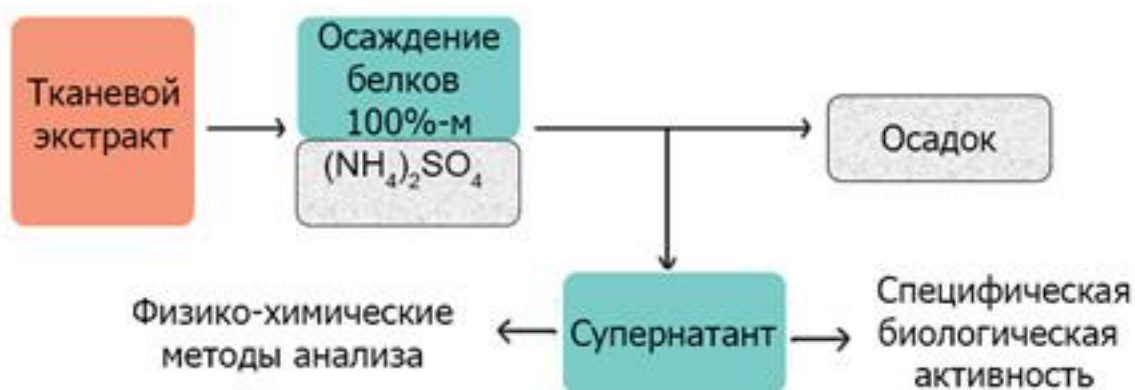


Рисунок 1. Схема выделения и очистки биологически активных пептидов.

Аналогичную мембранотропную активность, характеризующуюся наличием полимодальной дозовой зависимости, проявляли все тканевые экстракты, их супернатанты, полученные при высаливании из них белков сульфатом

аммония, а также ряд фракций, полученных после обращенно-фазовой ВЭЖХ (таблица 1).

Тканевые экстракты получали, помещая ткани морских беспозвоночных в физ. р-р при 4°C на несколько часов. Определение мембранотропной активности во фракциях в процессе их очистки осуществляли адгезиометрическим методом, позволяющим оценивать влияние исследуемого препарата на изменение вязкоупругих свойств ткани печени мышцы в условиях кратковременного органотипического культивирования *in vitro*. Данный метод в течение длительного времени применяется для биотестирования фракций, содержащих МГТБ, выделенных из различных источников. В качестве примера приведена диаграмма, отражающая мембранотропную активность фракции супернатанта, полученного при высаливании тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (рисунок 2).

Таблица 1. Дозы исследуемых препаратов, в которых проявлялась мембранотропная активность (исходная концентрация препаратов – 0,1 мг белка/мл)

Исследуемые объекты	Исследуемые препараты		
	Экстракт	после осаждения сульфатом аммония	
		Супернатант	Осадок
Гепатопанкреас краба	10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-11}	10^{-9} – 10^{-11}	Не проявлялась
Пресноводная жемчужница	10^{-12} – 10^{-14}	10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-11}	Не проявлялась
Мидии	10^{-5} – 10^{-6} ; 10^{-11} – 10^{-13} ;	10^{-11} – 10^{-12}	Не проявлялась
Культуральная среда <i>Fusarium s.</i>	10^{-11} – 10^{-13} ;	10^{-4} – 10^{-6} ; 10^{-8} – 10^{-11} ; 10^{-13} – 10^{-14}	10^{-10} – 10^{-12}

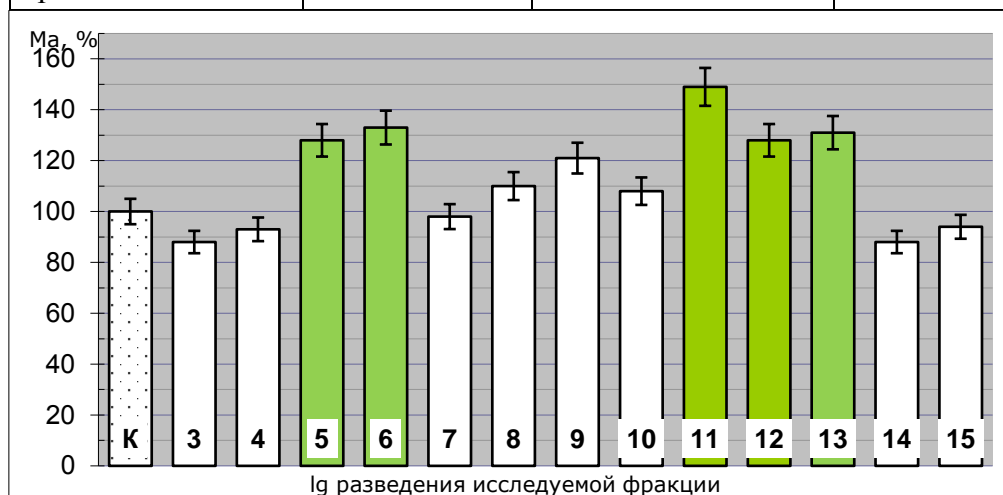


Рисунок 2. Мембранотропная активность тканевого экстракта мидий. По абсциссе – показатель степени последовательного 10-кратного разведения исходного препарата с концентрацией белка 0,1 мг/мл (К-контроль); по ординате - Ма, % - величина параметра, отражающего мембранотропную активность. Зелёным выделены разведения с достоверным отличием значения Ма от контрольного.

Выделение мембранотропных пептидов из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба

Супернатант, полученный высаливанием белков из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, далее разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, в результате чего были получены фракции со временем удерживания от 3,1 мин до 29,8 мин (рисунок 3). ВЭЖХ-фракции с временем удерживания 3,1; 5,9; 21,5; 22,4 мин были исследованы методами MALDI-TOF масс-спектрометрии, а также на проявление мембранотропной активности (таблица 2).

Таблица 2. Характеристики фракций, выделенных из экстракта гепатопанкреаса краба

Исследуемые фракции	Время удерживания (мин)	Молекулярные ионы, определенные методом MALDI-TOF	Наличие мембранотропной активности
ВЭЖХ	3,1	1052, 1096, 1152, 1166, 1252, 1335, 1435	130 ± 5%
ВЭЖХ	5,9	1059, 1261, 1328, 1347, 1504, 1821	нет
ВЭЖХ	21,5	1001, 1044, 1074, 1235, 1382, 1444, 1617, 1791, 1955, 1981, 2000, 2174	нет
ВЭЖХ	22,4	1059, 1160, 1346, 1509, 2077, 2104	нет
Супернатант	-	2824; 4144; 4862; 4977; 5035; 5645; 5840; 6167; 7400; 8646; 8856	149 ± 6%

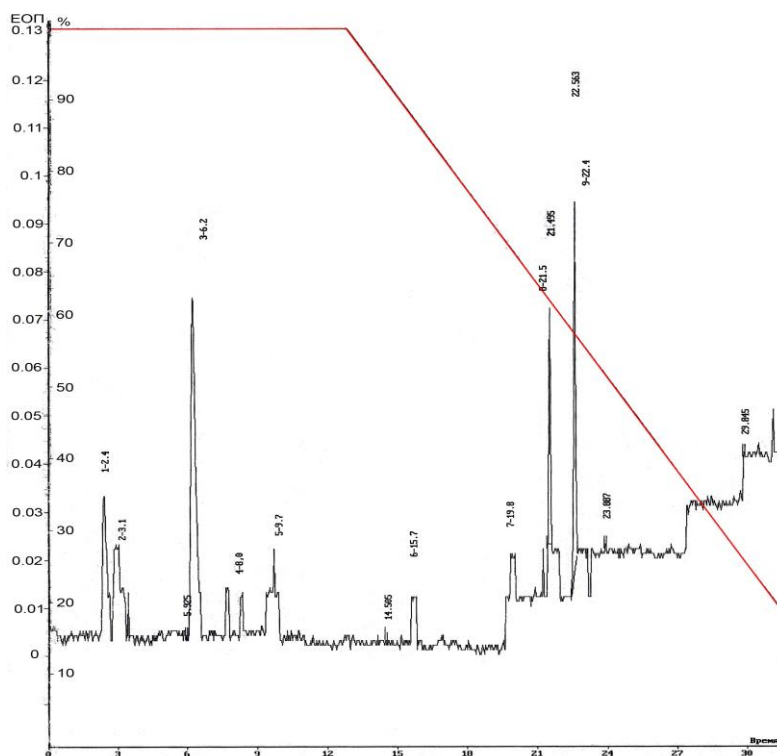


Рисунок 3. Разделение супернатанта, выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, методом ВЭЖХ в градиенте концентрации вода – ацетонитрил от 5% до 80% со скоростью элюции 0,5 мл/мин и временем элюции 30 минут на колонке С8. По абсциссе – время элюции в мин; по ординате – единицы оптической плотности при 280 нм.

Методом кругового дихроизма была изучена вторичная структура пептидов, содержащихся в супернатанте. Были получены следующие данные по составу вторичных белковых структур в этой фракции, в % содержания: α -спирали - 50,8; β -структуры параллельные - 2,5; β -структуры антипараллельные - 0,2; β -складки - 16,5; статистический клубок - 29,9. Методом динамического лазерного светорассеяния было показано образование в супернатанте крупных (около 250 нм) наноразмерных частиц. Электрофорез в ПААГ показал присутствие белка с молекулярной массой около 40 кДа (рисунок 4). Анализ результатов, полученных после его триптического гидролиза, проведенным по данным базы Mascot, показал высокую гомологию с щелочной фосфатазой (ЩФ) *Pseudomonas sp. Ag1* и *Pseudomonas fluorescens*. Согласно литературным данным, рентгеноструктурный анализ ЩФ, выделенных из бактерий и крабов показал, что строение их активного центра идентично. Этим, скорее всего, объясняется гомология белка, обнаруженного в супернатанте тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, с ЩФ бактерий. В пользу данного предположения свидетельствуют также результаты исследования мембранотропной активности препарата, полученного при взаимодействии смеси ВЭЖХ-фракций и осадка, полученного при высаливании тканевого экстракта сульфатом аммония. Образовавшийся препарат не проявлял мембранотропной активности после взаимодействия (таблица 3). Полученные данные позволяют высказать предположение о том, что ЩФ может быть белком-модулятором для мембранотропных пептидов (МП), присутствующих в гепатопанкреасе краба, а также на возможное сходство в строении биорегуляторов, выделенных из различных источников.

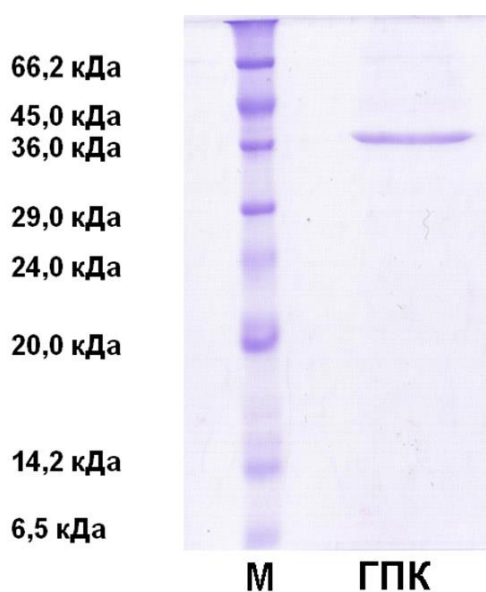


Рисунок 4. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракции супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (дорожка ГПК, обнаруженная высокомолекулярная фракция отмечена красной стрелкой). Маркерные белки (дорожка М): аprotинин из легкого быка - 6,5 кДа; α -лактальбумин - 14,2 кДа; соевый ингибитор трипсина - 20,0 кДа; трипсиноген из поджелудочной железы быка - 24,0 кДа; карбоангидраза - 29,0 кДа; глицеральдегид-3-фосфатгидрогеназа - 36,0 кДа; овальбумин - 45,0 кДа; бычий сывороточный альбумин - 66,2 кДа.

Таблица 3. Исследование мембранотропной активности препарата, образованного при взаимодействии объединенной пептидной фракции и осадка, выделенных из тканевого экстракта гепатопанкреаса.

Исследуемая фракция	Концентрация белка, мг/мл	Проявление мембранотропной активности
Смесь ВЭЖХ-фракций	0,01	130 ± 4%
Осадок, полученный при высаливании тканевого экстракта	0,1 мг/мл	нет
Смесь ВЭЖХ – фракций + осадок	0,11 мг/мл	нет

Выделение мембранотропных пептидов из двустворчатого моллюска жемчужницы *Margaritifera margaritifera*

Для получения экстрактов использовали взрослых особей пресноводной жемчужницы, содержащих глохидии. В качестве объекта сравнения изучали экстракт взрослых особей мидий. После обращенно-фазовой ВЭЖХ фракции супернатанта, полученного из тканевого экстракта жемчужницы, было получено нескольких гидрофильных фракций, выходящих в начале градиента вода-ацетонитрил. Сходная картина разделения была получена и при обращенно-фазовой ВЭЖХ фракции супернатанта, полученного из тканевого экстракта голубых мидий: также были обнаружены биологически активные гидрофильные фракции с временем удерживания от 6,2 до 14,0 мин в данных условиях. Методом электрофореза в ПААГ было показано наличие в экстракте, полученном из пресноводной жемчужницы, большого количества белков с различными молекулярными весами, особенно количественно представлены компоненты с мол. массами 10000 Да. В супернатанте же было показано присутствие только высокомолекулярной фракции с мол. массой около 66 000 Да. При этом на картине разделения методом электрофореза пептидная фракция не обнаруживалась (рисунок 5). Однако при исследовании супернатанта методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, было установлено, что в нем содержатся пептиды (таблица 4).

Таблица 4. Исследование мембранотропной активности фракций супернатантов тканевых экстрактов, полученных из двустворчатых моллюсков

Исследуемые фракции	Молекулярные ионы, определенные методом MALDI-TOF	Наличие мембранотропной активности
Супернатант тканевого экстракта жемчужницы	778; 833; 985; 1040; 1248; 1404; 1455; 1795; 2224; 2338; 2601; 4176	135 ± 3%
Супернатант тканевого экстракта мидий	1356; 1440; 1455; 1500; 2346; 2390; 2430; 2472; 3080	139 ± 3%

Следует отметить, что картина разделения супернатанта тканевого экстракта, выделенного из голубых мидий, при электрофорезе в ПААГ в

аналогичных условиях также продемонстрировала наличие высокомолекулярной фракции около 100 000 Да (рисунок 6), и при этом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии также были показаны небольшие пептиды (таблица 4). Методом кругового дихроизма раствора супернатанта, выделенного из тканевого экстракта пресноводной жемчужницы, было показано наличие вторичной структуры, характерной для МГТБ: α -спирали - 6,6%; β -структуры параллельные - 5,5%; β -структуры антипараллельные - 45,3%; β -складки - 16,0%; статистический клубок - 33,4%; для супернатанта из тканевого экстракта мидий - α -спирали - 4,9%; β -структуры: антипараллельные - 13,9%; параллельные - 2,2%; β -складки - 24,1%; статистический клубок - 54,5%. Методом динамического лазерного светорассеяния было установлено, что в растворе супернатанта тканевого экстракта пресноводной жемчужницы образуются наноразмерные частицы со средним диаметром около 350 нм, для супернатанта тканевого экстракта мидий - 150 нм.

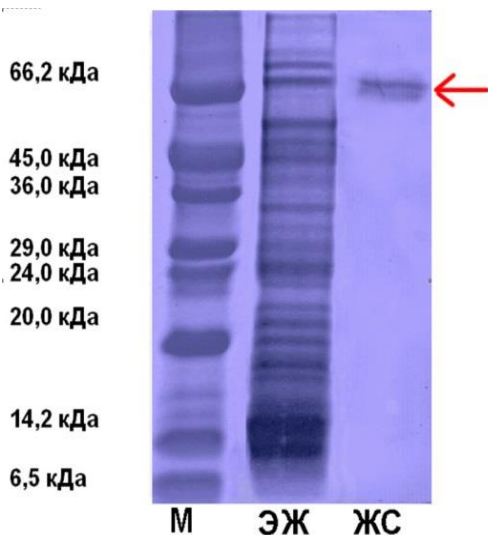


Рисунок 5. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из пресноводной жемчужницы. Слева направо: М - маркерные белки (апротинин из легкого быка - 6,5 кДа; α -лактальбумин - 14,2 кДа; соевый ингибитор трипсина - 20,0 кДа; трипсиноген из поджелудочной железы быка - 24,0 кДа; карбоангидраза - 29,0 кДа; глицеральдегид-3-фосфатгидрогеназа - 36,0 кДа; овальбумин - 45,0 кДа; бычий сывороточный альбумин - 66,2 кДа.), ЖЭ - тканевой экстракт жемчужницы, ЖС - супернатант тканевого экстракта жемчужницы (обнаруженная высокомолекулярная фракция обозначена красной стрелкой).

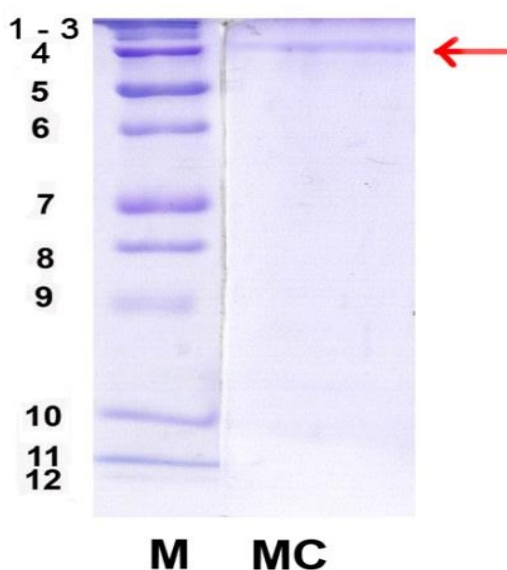


Рисунок 6. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из голубых мидий. Слева направо: М - маркерные белки (1 - 250 кДа; 2 - 150 кДа; 3 - 100 кДа; 4 - 75 кДа; 5 - 50 кДа; 6 - 37 кДа; 7 - 25 кДа; 8 - 20 кДа; 9 - 15 кДа; 10 - 10 кДа; 11 - 5 кДа; 12 - 2 кДа;), МС - супернатант тканевого экстракта мидий.

Таким образом, в экстрактах двустворчатых моллюсков жемчужницы *Margaritifera margaritifera* и голубых мидий были обнаружены МП, которые по характеру биологической активности и физико-химическим свойствам, оказались сходными с пептидами, входящими в состав МГТБ, выделенными из других источников.

Выделение мембранотропных пептидов из среды культивирования микроскопического гриба *Fusarium sambucinum*

Супернатант, выделенный из среды культивирования гриба *Fusarium s.* получали высаливанием белков сульфатом аммония; он проявлял мембранотропную активность. Электрофорез в ПААГ показал наличие белка с мол. массой около 66 000 Да; пептиды не были обнаружены (рисунок 7). Тем не менее, методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было показано, что данная фракция содержит ряд пептидов с молекулярной массой 1000 – 2100 Да (таблица 5).

Таблица 5. Характеристики фракции супернатанта и ВЭЖХ-фракций, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium Sambucinum**:

Название исследуемой фракции	Время удерживания, мин	Мембранотропная активность, %	Значения молекулярных масс пептидов, Да
Супернатант	-	158± 5	3770,4; 3893,5; 4055,7; 4178,7; 4340,9
Осадок	-	138± 5	1023,3; 1155,3; 1419,5; 1551,5; 1625,5; 1757,6; 1889,6; 2021,6
1-я ВЭЖХ-фракция	6,25	155± 5	1013,3; 1535,8; 2081,9
2-я ВЭЖХ-фракция	7,93	143± 5	1052,9; 1155,3; 1351,0
3-я ВЭЖХ-фракция	14,52	132± 5	1404,6; 1840,8
1-я+2-я+3-я ВЭЖХ-фракции	-	190± 8	-

* в каждом столбце приведены данные одного эксперимента соответствующей опытной серии, состоящей не менее чем из 3-х экспериментов.

Методом динамического лазерного светорассеяния было показано присутствие во фракции супернатанта наноразмерных частиц со средним размером около 180 нм. Обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрил-вода показано присутствие фракций, ряд которых (с временем удерживания 6,25 – 14,52 мин) проявлял мембранотропную активность (таблица 5). Кроме того, методом биотестирования была исследована композиция из ВЭЖХ-фракций с временем удерживания: 6,25 мин, 7,93 мин и 14,52 мин как суммарная гидрофильная фракция пептидов (таблица 4), которая оказалась

наиболее мембранотропно активной. Методом кругового дихроизма было показано, что вторичная структура пептидов, входящих в состав как супернатанта, так и отдельных ВЭЖХ-фракций, характеризуется преимущественным содержанием β – структур и статистического клубка (таблица 6).

Таблица 6. Вторичная структура мембранотропных пептидов, содержащихся в супернатанте и ВЭЖХ-фракциях, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium s.*

Элементы вторичной структуры	Исследуемая фракция			
	Супернатант	1-ая ВЭЖХ-фракция	2-ая ВЭЖХ-фракция	3-я ВЭЖХ-фракция
α -спирали	22,6 ± 0,1	8,4 ± 0	4,3 ± 0,03	6,1 ± 0,05
β – структуры (антипараллельные)	45,5 ± 0,1	36,8 ± 0,1	66,2 ± 0,15	45,5 ± 0,1
β -структуры (параллельные)	2,1 ± 0,02	5,7 ± 0,05	4,1 ± 0,05	5,2 ± 0,05
β - складки	2,5 ± 0,05	14,7 ± 0,08	9,7 ± 0,07	15,5 ± 0,08
Статистический клубок	27,2 ± 0,1	34,3 ± 0,1	15,7 ± 0,08	27,7 ± 0,1

Суммируя полученные результаты по исследованию физико-химических свойств веществ, выделенных тканей морских беспозвоночных и культуральной среды гриба *Fusarium s.*, можно заключить: 1) эти вещества представляют собой небольшие пептиды с молекулярной массой до 9000 Да; 2) они характеризуются элюцией в гидрофильной области градиента ацетонитрил-вода (до 40% ацетонитрила); 3) эти вещества проявляют тенденцию к межмолекулярной ассоциации и образуют крупные (150–350 нм) наноразмерные частицы; они проявляют характерную для МГТБ мембранотропную активность, которая характеризуется проявлением в СМД и наличием полимодальной дозовой зависимости.

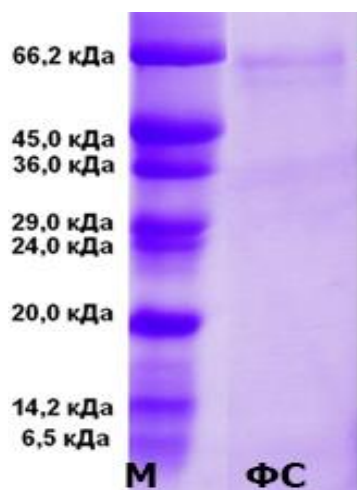


Рисунок 7. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из гриба *Fusarium s.* Слева направо: М - маркерные белки (апротинин из легкого быка - 6,5 кДа; α -лактальбумин – 14,2 кДа; соевый ингибитор трипсина – 20,0 кДа; трипсиноген из поджелудочной железы быка – 24,0 кДа; карбоангидраза – 29,0 кДа; глицеральдегид-3-фосфатгидрогеназа – 36,0 кДа; овальбумин – 45,0 кДа; бычий сывороточный альбумин – 66,2 кДа.), ФС - супернатант культуральной среды *Fusarium s.* (обнаруженная высокомолекулярная фракция обозначена красной стрелкой).

Данные литературы свидетельствуют о том, что тенденцию к межмолекулярной ассоциации проявляют пептиды со вторичной структурой, характеризующейся преимущественным содержанием неупорядоченных участков и β -структур. Именно такая вторичная структура была обнаружена при исследовании пептидов, входящих в состав фракций, полученных из тканевых экстрактов морских беспозвоночных и культуральной среды гриба. Отсутствие низкомолекулярной фракции пептидов при ПААГ-электрофорезе исследуемых супернатантов всех тканевых экстрактов и культуральной среды гриба можно объяснить способностью пептидов формировать крупные наноразмерные ассоциаты, а также их взаимодействием с белками, модулирующими активность пептидов. Для гепатопанкреаса краба таким модулятором, возможно, является щелочная фосфатаза. Полученные результаты позволяют заключить, что во всех исследуемых объектах удалось обнаружить МП, сходные по характеру мембранотропной активности и физико-химическим свойствам с МГТБ.

Изучение специфической биологической активности

В данном исследовании использовали следующие экспериментальные животные:

- крысы линии Wistar (150–200 г, 155 шт., ♂);
- мыши поколения F1 C57Bl/СВА (16–20 г, 50 шт., ♂),
- тритоны *Pleurodeles waltl* (половозрелые, длина 10–12 см, ♂, 23 шт).

МП, выделенные из морских беспозвоночных и культуральной среды гриба *Fusarium s.*, были изучены на проявление гепатопротекторного и ранозаживляющего действия. Для этого использовали модель роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*, модель СС1₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*, а также модель экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*. Модель СС1₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo* была применена не только с целью исследовать МП как гепатопротекторы, но и для сопоставления результатов этого исследования и экспериментов, полученных на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*. Все изучаемые препараты исследовали в дозах, соответствующих концентрациям, проявляющим мембранотропную активность.

Роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона in vitro

Печень амфибий по своему строению близка к печени млекопитающих. Существенными отличиями являются, во-первых, сохранение в этом органе кроветворения у взрослых особей, а во-вторых, наличие у амфибий пигментированных клеток. Данные клетки функционируют как макрофаги,

поглощая различные частицы, например, микроорганизмы, вирусы, а также осуществляют детоксикацию различных ксенобиотиков. Как было установлено, дополнительная активация пигментированных клеток (увеличение их количества и миграции с образованием клеточных кластеров) связана с условиями обитания амфибий. Поэтому параметром, позволяющим оценить активацию пигментированных клеток в данной модели, выбрали площадь их кластеров, которая оценивается на гистологических срезах органных культур в различных экспериментальных сериях. Ранее в исследовании действия МГТБ, выделенного из печени млекопитающего (крысы) на ткань печени амфибии (тритона), было показано, что он активировал пигментированные клетки печени тритона, в результате чего образовывались большие кластеры этих клеток, площадь которых отличалась от площади таковых в контрольных сериях.

Биологическое действие фракций, полученных из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба

В данном эксперименте исследовали влияние супернатанта, выделенного из гепатопанкреаса краба, на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании ткани *in vitro*; в качестве положительного контроля использовали супернатант, полученный из тканевого экстракта печени крыс Wistar, а также фармакологический препарат Эссенциале форте как применяемый в практике медицины гепатопротектор. Были поставлены следующие экспериментальные серии: 1) контрольная, в питательную среду с культурами ничего не добавляли; 2) опытная №1, с добавлением фармакологического препарата Эссенциале форте; дозу рассчитывали на массу тела тритона от терапевтической согласно инструкции; 3) опытная №2, в питательную среду добавляли фракцию супернатанта, выделенную из тканевого экстракта печени крыс Wistar; 4) опытная №3, в питательную среду добавляли фракцию супернатанта, выделенную из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба.

Результаты этого эксперимента (таблица 7) свидетельствуют о способности фракции супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба активировать пигментированные клетки печени амфибии, выполняющие защитную функцию в этом органе. Важно, что в данном эксперименте обнаружено сходство биологического действия супернатантов тканевых экстрактов печени беспозвоночного и млекопитающего. Таким образом, в этом эксперименте был продемонстрирован тканеспецифический характер действия мембранотропных пептидов, выделенных из гепатопанкреаса краба. Следует отметить, что на данной модели лекарственное средство Эссенциале форте также проявляло активность. В отдельном эксперименте изучали

биологическое действие фракций, полученных после обращенно-фазовой ВЭЖХ супернатанта, выделенного из тканевого экстракта панкреаса краба.

Таблица 7. Влияние супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*

№ п/п	Экспериментальная серия	Доза исследуемого препарата (мг)	Параметр, отражающий площадь, занимаемую пигментированными клетками (%)*
1	Нативная печень тритона	-	4,78±0,05
2	Контроль (без добавления препаратов)	-	5,16±0,09 (p<0,05**)
3	Эссенциале форте	10 ⁻⁵	5,41±0,08 (p<0,05***)
4	Супернатант тканевого экстракта печени крысы	10 ⁻¹²	5,52±0,08 (p<0,05***)
5	Супернатант тканевого экстракта гепатопанкреаса краба	10 ⁻¹⁰	5,52±0,06 (p<0,05***)

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, по отношению к площади самого среза (в %);

** - по сравнению с нативной тканью;

***- по сравнению с контрольной группой.

В этом эксперименте, а также при исследовании ВЭЖХ-фракций, выделенных из тканевых экстрактов других беспозвоночных, изучали действие композиции данных фракций, приготовленной путем их смешивания. Это связано, во-первых, со способностью пептидов, входящих в состав МГТБ, образовывать крупные наноразмерные частицы и, именно, в этом состоянии проявлять биологическую активность. Во-вторых, изучение биологического действия композиции ВЭЖХ-фракций, на наш взгляд, может способствовать поиску вещества, модулирующего активность мембранотропных пептидов. Полученные данные показывают (таблица 8), что выраженную биологическую активность проявляли: фракция супернатанта, а также ВЭЖХ-фракции 2, 3, 6 (выделены в таблице 8). Все остальные ВЭЖХ-фракции не оказывали достоверного биологического действия. Примечательно, что на данной модели не проявляла активности суммарная пептидная фракция (композиция ВЭЖХ-фракций 1 – 9). Но наибольший эффект на пигментированные клетки печени тритона оказал восстановленный комплекс, полученный при взаимодействии объединенной пептидной фракции и осадка, полученный высаливанием белков из тканевого экстракта.

Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о роли щелочной фосфатазы как белка-модулятора для МП гепатопанкреаса краба.

Таблица 8. Влияние различных фракций, выделенных из супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании ткани *in vitro*.

Исследуемая фракция	Время удерживания для ВЭЖХ-фракций (мин)	Параметр, отражающий площадь, занимаемую пигментированными клетками (%)*
Контроль	-	1,03±0,06
Супернатант	-	1,23±0,08 (p<0,05**)
ВЭЖХ 1	2,4	1,10±0,13 (p>0,5)
ВЭЖХ 2	3,1	1,30±0,09 (p <0,05**)
ВЭЖХ 3	6,2	1,61±0,06 (p <0,01 **)
ВЭЖХ 4	8,0	0,87±0,11 (p >0,5)
ВЭЖХ 5	9,7	0,86±0,06 (p >0,5)
ВЭЖХ 6	15,7	1,39±0,09 (p<0,01 **)
ВЭЖХ 7	19,8	0,91±0,05 (p >0,5)
ВЭЖХ 8	21,5	1,11±0,07 (p >0,5)
ВЭЖХ 9	22,4	0,88±0,09 (p >0,5)
Суммарная пептидная фракция (1–9)	-	1,07±0,16 (p>0,5)
Пептидная фракция + осадок	-	1,90±0,09 (p <0,01**)

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, по отношению к площади самого среза (в %);

** - достоверное отличие от контрольной группы

*Биологическое действие фракций, полученных из культуральной среды мицелия *Fusarium sambucinum**

На модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro* были изучены фракции, полученные из культуральной среды гриба *Fusarium s.* Были исследованы следующие фракции: супернатант, ВЭЖХ-фракции, полученные при его разделении; в качестве положительного контроля был взят супернатант, полученный из тканевого экстракта печени крысы. Результаты данного исследования представлены в таблице 9. Результаты культивирования показывают, что кроме 2-й ВЭЖХ-фракции все

остальные мембранотропно-активные препараты, выделенные из культуральной среды гриба *Fusarium s*, способствуют увеличению площади пигментированных клеток в печени тритона. При этом наибольший количественный результат был показан при действии объединенной пептидной фракции. Следует отметить, что данная фракция проявляла также и выраженную мембранотропную активность (таблица 5). Учитывая тенденцию пептидов к образованию межмолекулярных ассоциатов, можно предположить, что в данном случае образовался пептидный комплекс, который проявлял выраженную биологическую активность.

Таблица 9. Влияние супернатанта и ВЭЖХ-фракций, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium sambucinum*, на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*.

Название исследуемой фракции	Время удерживания для ВЭЖХ-фракций, мин	Параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона (%)*
Нативная печень тритона	-	0,89±0,04
Контроль	-	0,79±0,05 (p>0,5)
Супернатант, выделенный из культуральной среды гриба <i>Fusarium s</i>.	-	0,94±0,08 (p<0,05**)
1-ая ВЭЖХ-фракция	6,25	1,22±0,08 (p<0,01**)
2-ая ВЭЖХ-фракция	7,93	0,98±0,12 (p<0,1)
3-я ВЭЖХ-фракция	14,52	1,26±0,05 (p<0,01**)
1+2+3 фракции ВЭЖХ	-	1,31±0,05 (p<0,01**)
Супернатант, выделенный из тканевого экстракта печени крысы	-	1,14±0,08 (p<0,01**)

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, по отношению к площади самого среза (в %);

** - достоверное отличие от контрольной группы

Биологическое действие фракций, полученных из тканей двустворчатых моллюсков

Исследование биологической активности фракций, выделенных из тканевых экстрактов двустворчатых моллюсков, проведенное на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*, показало отсутствие изменения состояния ткани печени по сравнению с контролем (таблица 10). В данном случае были исследованы дозы, в которых

эти вещества проявляли мембранотропную активность (таблица 1). На наш взгляд, полученные данные еще раз указывают на тканеспецифический характер активности, проявляемой МГТБ-подобными веществами, выделенными из тканей беспозвоночных животных.

Таблица 10. Влияние фракций, выделенных из тканевых экстрактов двустворчатых моллюсков, на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*

Название экспериментальной фракции	Доза, мг	Параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона (%)*
Контроль	-	1,33±0,26
Супернатант, выделенный из экстракта жемчужницы	10 ⁻¹¹	1,35±0,26; p>0,5
Супернатант, выделенный из экстракта мидий	10 ⁻¹¹	1,35±0,48; p>0,5

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, по отношению к площади самого среза (в %);

Экспериментальный фиброз печени крыс in vivo

Были исследованы препараты, которые проявляли биологическую активность на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*, а именно супернатант, выделенный из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба и супернатант, выделенный из культуральной среды *Fusarium s.* В качестве положительного контроля изучали супернатант, выделенный из тканевого экстракта печени крыс, а также лекарственное средство Силимар. Для оценки степени фиброзного поражения ткани печени крыс в эксперименте определяли параметр, отражающий площадь фибротической ткани в печени животных во всех экспериментальных сериях. Для этого снимки гистологических срезов, окрашенных по Маллори, изучали с помощью свободно распространяемой программы для визуальной обработки изображений «ImageJ». Анализ полученных результатов (таблица 11) показывает, что препарат, выделенный из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, не только эффективно проявлял свойства гепатопротектора, но и действовал по механизму, отличному от действия препарата, выделенного из печени крыс, а также культуральной среды *Fusarium s.* и Силимара: он способствовал значительному торможению развития фиброза на начальной стадии, а также уменьшению степени жировой дистрофии и поддерживал состояние паренхимы во второй части эксперимента, когда отсутствовало воздействие гепатотоксина.

Таблица 11. Влияние исследуемых препаратов на развитие CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*

Группа животных	Исследуемый препарат	Площадь фиброзной ткани / площадь среза (%);	
		60 дней	120 дней
1	Контроль	1,7±0,09	5,6±0,06
2	Супернатант экстракта печени крысы	3,6±0,08	3,4±0,07
3	Супернатант экстракта гепатопанкреаса краба	1,8±0,05	1,8±0,06
4	Супернатант экстракта культуральной среды <i>Fusarium s.</i>	1,4±0,08	2,9±0,09
5	Силимар	3,8±0,07	2,2±0,04

Изученные в данной работе мембранотропные пептиды, выделенные из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба и культуральной среды *Fusarium s.*, проявляли гепатопротекторное действие: на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона – активируя клетки, проявляющие защитные функции в печени амфибий; на модели CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс – препятствуя развитию патологического процесса путем торможения фибротических образований и развития жировой дистрофии в печени млекопитающих.

Полученные результаты позволяют поставить вопрос о возможном применении роллерного органотипического культивирования печени амфибий *in vitro* в качестве новой модели для исследования гепатопротекторного свойства биологически активных веществ.

Таблица 12. Влияние ряда фармакологических препаратов на пигментированные клетки печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*.

Название экспериментальной серии	Доза действующего вещества, мг	Параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона (%)*
Контроль	-	0,81±0,04
Эссенциале форте	0,1	1,52±0,11 p<0,01**
Галстена	0,05	0,74±0,06 (p>0,5)
Гепарис клиник	~10 ⁻⁶	1,35±0,07 p<0,05**
Лив52	0,07	1,33±0,05 p<0,05**

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, к площади всего среза (в %);

** - достоверное отличие от контроля.

В этом аспекте было проведено отдельное исследование биологического действия ряда гепатопротекторов на ткань печени тритона при роллерном

органотипическом культивировании *in vitro*. Были изучены следующие фармакологические препараты: Эссенциале форте, Галстена, Лив52, Гепарис клиник. Приведенные в таблице 12 результаты показывают, что на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* известные препараты с гепатопротекторным действием действительно оказывают влияние на пигментированные клетки печени тритона, выполняющие в этом органе защитную функцию. К этому ряду можно добавить и используемый в настоящее время Силимар, действие которого на данной модели и экспериментальной модели CCl₄-индуцированного фиброза печени у крыс было продемонстрировано нами ранее (таблица 11). Таким образом, результаты, полученные с использованием двух экспериментальных моделей – роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона *Pleurodeles waltl in vitro* и CCl₄-индуцированного фиброза печени у крыс *in vivo* – при исследовании биологически активных фракций, выделенных из тканевых экстрактов гепатопанкреаса краба и культуральной среды *Fusarium s.*, свидетельствуют об их корреляции между собой. Суммирование этих данных дает основание для рекомендации модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* в качестве первичного скрининга биологически активных веществ для выявления их возможного гепатопротекторного действия.

Заживление экспериментальной кожной раны у мышей in vivo

Продолжение исследования тканеспецифического характера действия для мембранотропных пептидов, выделенных из гепатопанкреаса краба, двустворчатых моллюсков (жемчужницы и голубых мидий), а также культуральной среды *Fusarium s.*, было проведено на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*. В качестве препарата сравнения в данном эксперименте был взят биорегулятор сыворотки крови, проявлявший выраженное ранозаживляющее и регенерирующее действие на кожу мышей на данной модели. Кроме препарата, выделенного из пресноводной жемчужницы и препарата сравнения – биорегулятора сыворотки крови, во всех случаях наблюдали эпителизацию области раны с образованием соединительнотканного рубца, состояние которого не отличалось от состояния рубца в контроле (рисунок 8). Контролями являлись группы животных с не обрабатываемой раной и раной, обрабатываемой физиологическим раствором.

Исследование препарата, выделенного из пресноводной жемчужницы Margaritifera m.

В отличие от животных контрольных групп, при воздействии фракции, выделенной из пресноводной жемчужницы, происходила полная

реэпителизация области раны и наблюдали стимуляцию ранозаживления. Интересно отметить, что восстановление эпителия происходило за счет связанных с эпидермисом и разворачивающихся в него эпителиальных мешочков (рисунок 8). Данные структуры сформированы одним слоем эпителия и представляют собой замкнутые сферические структуры, образующиеся внизу дермального слоя. В процессе заживления раны эпителиальные мешочки начинали мигрировать из глубины дермы к поверхности эпителия, встраивались в эпителиальный слой, тем самым восстанавливая его. Здесь следует отметить сходство наблюдаемой картины регенерации с таковой при экспериментальном заживлении ожоговых травм у безволосых мутантных мышей Hr^{hr}/Hr^{hr} в условиях *in vivo*. У мутантных мышей происходит существенное изменение морфологии волосяных фолликулов и нарушается основная его функция – формирование волоса, но при этом остаются дермальные цисты, которые могут являться источниками эпителиальных стволовых клеток и участвовать в репарации кожи при повреждениях. Картина влияния фракции супернатанта, полученного из экстракта мидий, принципиально не отличалась от контрольной раны. Отсутствуют признаки восстановления волосяного покрова, желез и их протоков. Дерма уплотненная, эпидермис утолщен. Таким образом, можно сделать вывод, что супернатант, полученный из экстракта мидий, не оказывал никакого влияния на процесс ранозаживления кожи у мышей *in vivo*. Проявление ранозаживляющего действия препаратом, выделенным из жемчужницы, очевидно, связано со своеобразием жизненного цикла этого моллюска. Процесс оплодотворения у двустворчатых моллюсков происходит в мантийной полости самки, глохидии развиваются в ее жабрах, а затем выходят в водную среду, в которой способны прикрепляться к жабрам рыб. Например, глохидии жемчужницы прикрепляются к жабрам лосося, при этом вокруг личинок образуются плотные эпителиальные капсулы, которые полностью покрывают их в жабрах в течение 24 часов. Возможно, что глохидии способны к стимуляции роста эпителия у рыб. Другие виды двустворчатых моллюсков, в том числе и голубые мидии, размножаются и развиваются за счет взаимного оплодотворения и не имеют подобной паразитической стадии развития. На наш взгляд, подобное отличие пути развития пресноводной жемчужницы от остальных двустворчатых моллюсков является обстоятельством, определяющим ранозаживляющее свойство биологически активных веществ, вырабатываемых глохидиями. Таким образом, полученные результаты указывают на наличие видовой специфичности биологического действия МП, выделенных из различных видов двустворчатых моллюсков.

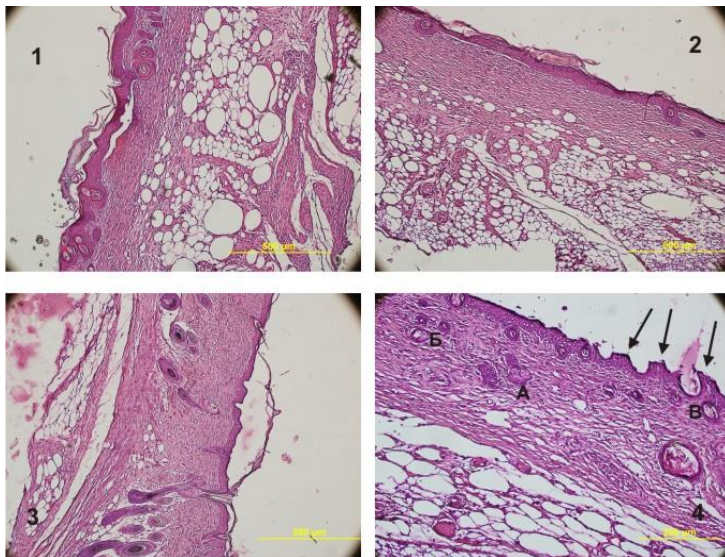


Рисунок 8. Гистологические срезы экспериментальной раны кожи мыши. 1 – контроль; 2- действие физиологического раствора; 3 – действие сывороточного биорегулятора в дозе, соотв. 10^{-14} мг белка/мл; 4 – действие супернатанта тканевого экстракта жемчужницы в дозе, соответствующей 10^{-14} мг белка/мл

Исследование мембранотропных пептидов, выделенных из гепатопанкреаса краба и культуральной среды Fusarium

Анализ гистологических срезов ткани кожи мышей на модели экспериментальной раны кожи *in vivo* показал, что на 11-е сутки опыта состояние ткани кожи у животных опытных и контрольных серий не различалось. У всех животных отсутствовала нормальная структура ткани, дерма уплотненная, состоящая из плотных тяжей коллагеновых волокон. Эпидермис утолщен, отсутствовали протоки потовых и сальных желез, волосяной покров и фолликулы. В целом можно заключить, что в экспериментальных сериях животных, обработанных фракциями, выделенными из экстракта гепатопанкреаса краба и культуральной среды *Fusarium s.* образуется соединительнотканый рубец, состояние которого не отличается от мышей контрольной серии. Таким образом, только при исследовании МП, выделенных из моллюска пресноводной жемчужницы, на данной модели наблюдалось восстановление структуры кожи. Для всех остальных препаратов, изученных в данной работе, наблюдалось заживление раны путем образования плотного соединительнотканного рубца.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что из тканей морских беспозвоночных животных: гепатопанкреаса краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*, двустворчатых моллюсков пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera* и мидий *Mytilus edulis*, а также среды культивирования микроскопического гриба *Fusarium sambucinum*, выделены мембранотропные пептиды, по своим физико-химическим свойствам и характеру мембранотропной активности сходные с пептидами, обнаруженными ранее в составе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из тканей млекопитающих и растений.

2) Показано, что мембранотропные пептиды, обнаруженные в тканях морских беспозвоночных животных и культуральной среде гриба *Fusarium sambucinum*, обладают молекулярной массой 1000 – 5000 Да, присутствуют в растворах в виде наноразмерных частиц (150– 300 нм), а также проявляют биологическое действие в сверхмалых дозах.

3) Показано, что в отличие от мембранотропных пептидов, выделенных из голубых мидий *Mytilus edulis*, мембранотропные пептиды, выделенные из пресноводной жемчужницы *Margaritifera margaritifera*, проявляют ранозаживляющее действие на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*, способствуя эпителизации раны и восстановлению структуры ткани кожи без образования соединительнотканного рубца.

4) Показано, что выделенные из ткани гепатопанкреаса краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*, а также культуральной среды микроскопического гриба *Fusarium sambucinum*, мембранотропные пептиды способствуют увеличению параметра, отражающего площадь, занимаемую пигментированными клетками на гистологических срезах печени тритона *Pleurodeles waltl* при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*.

5) Показано, что мембранотропные пептиды, выделенные из экстрактов ткани гепатопанкреаса краба *Paralithodes camtschaticus*, а также культуральной среды гриба *Fusarium sambucinum*, замедляют процесс развития фибротических изменений в ткани печени на модели CCl₄-индуцированного фиброза у крыс *in vivo*.

6) Показано, что выделенные из тканей беспозвоночных животных мембранотропные пептиды влияют на ткань печени позвоночных животных (тритонов и крыс) в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* аналогично пептидам, входящим в состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов тканей позвоночных животных.

7) Показано, что модель роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *Pleurodeles waltl* может быть использована для изучения гепатопротекторного действия биологически активных веществ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Богданов, В.В. Пептидосодержащая фракция из культуральной среды *Fusarium sambucinum*: состав и биологическое действие / В.В. Богданов, Э.Ф. Фаткулина, Б.Б. Березин, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 2. – С. 177–183.

2. Краснов М.С. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов новой группы, выделенных из тканей моллюска (*Margaritifera margaritifera*) и ряда растений / М.С. Краснов, В.В. Богданов, О.Г. Куликова, А.П. Ильина, Б.Б. Березин, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Фундаментальные исследования. – 2014. – №5. – С. 63–70.

3. Богданов, В.В. Биологически активные пептиды гепатопанкреаса камчатского краба / Богданов В.В., Березин Б.Б., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 4. – С. 1–7.
4. Богданов, В.В. Разработка лекарственных средств на основе мембранотропных эндогенных биорегуляторов / В.В. Богданов, Д.И. Мальцев, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сб. научных трудов конференции «Новые химико-фармацевтические технологии», вып. 184 под ред. Авраменко Г.В., Коваленко А.Е. – Москва. – 2012. – С. 233–239.
5. Ямскова, В.П. К вопросу о механизме действия сверхмалых доз / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, Д.И. Мальцев, О.Г. Куликова, Е.Ю. Рыбакова, В.В. Богданов, И.А. Ямсков // Научные труды VI Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 80.
6. Богданов, В.В. Биорегуляторы новой группы, выделенные из среды культивирования гриба *Fusarium Sambucinum* / В.В. Богданов, Э.Ф. Фаткулина, Б.Б. Березин, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник научных трудов IV международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки. – Владикавказ. – 2013. – Т.2. – С. 3–5.
7. Ямскова, В.П. Новая группа мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов: идентификация, физико-химические свойства и биологическое действие / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, В.В. Богданов, А.П. Ильина, О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, И.А. Ямсков // Сборник научных трудов Института генетики и цитологии НАН Беларуси, гл. ред. Кильчевский В. А. – Минск: ГНУ «Институт цитологии и генетики НАН Беларуси». – 2013. – Т. 14. – С. 14–23.
8. Богданов, В.В. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени крыс, гепатопанкреаса краба и гриба *Fusarium sambucinum* на развитие экспериментального фиброза в печени крыс *in vivo* / В.В. Богданов, Д.И. Мальцев, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник научных трудов III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы естественных и математических наук в современных условиях развития страны». – Санкт-Петербург. – 2016. – С. 51–56.
9. Богданов, В.В. Новый мембранотропный биорегулятор, выделенный из ткани гепатопанкреаса камчатского краба / В.В. Богданов, Б.Б. Березин, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Труды XIII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». – Москва. – 2013. – С. 135–138.
10. Богданов, В.В. Гепатопротекторное действие пептидов, выделенных из гепатопанкреаса краба / В.В. Богданов, Б.Б. Березин, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник тезисов 18-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология XXI века». – Пушино. – 2014. – С. 63.
11. Богданов, В.В. Изучение пептидных фракций, выделенных из гепатопанкреаса краба: физико-химические свойства и гепатопротекторная активность / В.В. Богданов, Б.Б. Березин, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник тезисов 19-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология XXI века». – Пушино. – 2015. – С. 7.
12. Богданов, В.В. Мембранотропный биорегулятор, выделенный из гепатопанкреаса краба: количественная оценка гепатопротекторной активности / В.В. Богданов, Д.И. Мальцев, О.Г. Куликова, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник тезисов 20-й Международной Пушинской школы-конференции «Биология XXI века». – Пушино. – 2016. – С.7.