

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ им. А.Н.
НЕСМЕЯНОВА

На правах рукописи

Богданов Всеволод Владимирович

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

03.01.02 – биофизика

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор Ямсков И.А.

доктор биологических наук, профессор Ямскова В.П.

Москва 2017

Оглавление	2
Список использованных сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1. Общая характеристика мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов	11
1.2 Физико-химические свойства и особенности строения МГТБ	20
1.3 Специфическая биологическая активность МГТБ	23
Глава 2. Материалы и методы	38
2.1 Получение тканевых экстрактов	39
2.2 Получение супернатантов тканевых экстрактов	40
2.3 Определение концентрации белка	40
2.4 Определение мембранотропной активности при кратковременном органном культивировании печени мыши <i>in vitro</i>	41
2.5 Электрофорез белковых фракций в полиакриламидном геле	43
2.6 Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле	44
2.7 Определение вторичной структуры с помощью метода кругового дихроизма	44
2.8 Определение размеров частиц методом лазерной корреляционной спектроскопии	45
2.9 Обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография	45
2.10 MALDI –TOF масс-спектрометрический анализ	45
2.11 Роллерное органотипическое культивирование печени тритона <i>in vitro</i>	46
2.12 Приготовление гистологических срезов	47
2.13 Морфометрическая оценка гистологических срезов	47
2.14 Экспериментальный фиброз печени крыс	48
2.15 Морфометрическая оценка ткани печени крыс	49
2.16 Влияние исследуемых фракций на заживление кожной раны у мышей <i>in vivo</i>	49

Глава 3. Результаты и их обсуждение	51
3.1 Выделение МГТБ из ткани гепатопанкреаса краба	52
3.2 Выделение МП из двустворчатого моллюска жемчужницы <i>Margaritifera margaritifera</i>	63
3.3 Выделение МП из среды культивирования микроскопического гриба <i>Fusarium sambucinum</i>	74
3.4 Изучение специфической биологической активности	83
3.4.1 Роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона <i>in vitro</i>	84
3.4.2 Экспериментальный фиброз печени крыс <i>in vivo</i>	95
3.4.3 Заживление экспериментальной кожной раны у мышей <i>in vivo</i>	106
Заключение	112
Выводы	116
Список литературы	118

Список использованных сокращений

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

КРС – крупный рогатый скот

МГТБ – мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы

МП – мембранотропные пептиды

ПААГ – полиакриламидный гель

ПМ – плазматическая мембрана

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СМД – сверхмалые дозы

ЩФ – щелочная фосфатаза

FITC – флуоресциина изотиоцианат

ММР – матриксные металлопротеиназы

TEMED – тетраметилэтилендиамин

TGF – тканевой фактор роста

TNF – фактор некроза опухоли

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 СС1₄-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 Пуцинской 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общая характеристика мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) были обнаружены в различных тканях позвоночных животных, а также растений [1, 2]. На основании сходства проявляемых физико-химических свойств и характера биологического действия они были выделены в отдельную группу биорегуляторов. Для МГТБ была показана локализация в межклеточном пространстве как в животных, так и в растительных тканях. Важнейшим свойством МГТБ является проявление ими биологической активности в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих 10^{-8} – 10^{-15} мг белка в мл. Именно в области СМД данные биорегуляторы влияют на ряд важнейших клеточных процессов (адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток), а также стимулируют заживление и восстановление при травматических повреждениях или патологиях ткани. Еще одним важнейшим свойством МГТБ является отсутствие видовой специфичности биологического действия при проявлении тканевой специфичности. В процессе поиска и изучения МГТБ были разработаны оригинальные методики их выделения из тканей, очистки и изучения физико-химических свойств, а также исследование специфической биологической активности, которое проводилось на различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Присутствие МГТБ в исследуемых препаратах определялось с помощью метода биотестирования, основанного на измерении мембранотропных свойств МГТБ [1, 2].

Основные экспериментальные подходы к исследованию молекулярных механизмов клеточной адгезии

МГТБ были обнаружены как адгезивные молекулы в тканях высших позвоночных животных [3–5]. В биологии термин «адгезия» описывает, в

частности, контактные взаимодействия клеток друг с другом, а также с естественными субстратами, например, внеклеточным матриксом (ВКМ).

Пространственная организация тканей основана на строго определенном и позиционированном расположении клеток. Последнее определяется морфологией клеток, миграцией и делением, а также их взаимодействием с ВКМ как одной из основных структур межклеточного пространства ткани. Пространственное расположение и сцепление клеток друг с другом осуществляется путем различных молекулярных взаимодействий. Сумма этих взаимодействий и лежит в основе явления, называемого в целом клеточной адгезией. Клеточная адгезия играет принципиальную роль в регуляции таких жизненно важных биологических процессов, как миграция, пролиферация и дифференцировка клеток, генная экспрессия, сигнальная трансдукция и морфогенез [6–8].

Методами иммунохимии оказалось возможным определить только ограниченное количество молекул межклеточной адгезии. Очевидно, это связано с отсутствием способности некоторых адгезивных молекул проявлять выраженные антигенные свойства. Тем не менее, с помощью такого экспериментального подхода к поиску молекул адгезии удалось идентифицировать значительную их часть и сформировать представление о строении межклеточного пространства тканей и входящих в его состав надмолекулярных структур и отдельных адгезивных сайтов. В этом аспекте поиск ранее не изученных молекул адгезии, их свойств и биологического действия продолжает оставаться одной из самых актуальных проблем современной клеточной биологии.

Следует отметить, что еще в начале исследования проблемы клеточной адгезии возникли совершенно другие подходы к изучению ее молекулярных механизмов. Так, например, еще в 1907 году были проведены эксперименты по агрегации одиночных клеток, используя в качестве объекта исследования морских губок [9]. Используя специальные сита, губок разделяли на очень мелкие фрагменты, которые далее в морской воде были способны агрегировать с образованием полноценно функционирующего организма. Подобные исследования были проведены позже и на клетках позвоночных животных. Было

показано, что клетки тканей одного органа эмбрионов разных классов позвоночных (например, гепатоциты цыпленка и мышцы) образовывали смешанные агрегаты – химеры. В этих исследованиях удалось установить тканеспецифический, но не видоспецифический характер процесса реагрегации [10]. В процессе этого исследования был разработан метод, позволивший изучать процесс реагрегации клеток. Ткани органа обрабатывали раствором трипсина в отсутствие ионов Са и Mg. Процесс реагрегации проводили на специально разработанном приборе – агрегометре, конструкция которого препятствовала взаимодействию культивируемых клеток с поверхностью стенок сосуда [11]. После определенного срока культивирования клеток в агрегометре производился подсчет как одиночных клеток, так и образовавшихся агрегатов. На основании этих данных делали вывод о биологическом действии исследуемого вещества, которое добавлялось в питательную среду. Этот метод стал широко использоваться исследователями, однако впоследствии стало понятным, что он может применяться только при поиске адгезивных молекул низших животных – например, морских губок [12] или эмбриональных клеток, причем на ранних стадиях эмбриогенеза, когда клетки далеки от дефинитивного состояния [10]. Стало очевидным, что клетки тканей высших животных, близкие к дефинитивному состоянию, неспособны синтезировать *de novo* компоненты клеточной поверхности и межклеточного пространства, разрушающиеся при воздействии протеаз. В связи с этим продолжали развиваться другие экспериментальные подходы к исследованию молекул адгезии и способов оценки параметров, отражающих состояние клеточной адгезии в ткани. Одним из таких подходов стала разработка метода по оценке параметра, отражающего вязкоупругие свойства ткани.

Данный методологический подход основан на представлениях об организации межклеточного пространства тканей, согласно которым ВКМ, а также ПМ и цитоскелет клеток образуют в ткани единую систему, основная функция которой заключается в «дирижировании» процессами межклеточного узнавания, клеточной дифференцировки, сигнальной трансдукции и морфогенеза [13–15]. Эта

система представляет собой не только биохимические сигнальные пути, но и образует единую структуру, обладающую определенными механическими свойствами [15].

При нарушении пространственной организации одной из этих супрамолекулярных структур, которое может возникнуть, к примеру, в условиях дефицита ионов кальция или при деформационных воздействиях, из ткани в основном выделяются целые клетки [3]. Изменение механических свойств в одной из перечисленных макромолекулярных структур клетки (ВКМ, ПМ, цитоскелет) приводит к изменению свойств всей этой интегральной системы.

Именно на этом механическом факторе межклеточного взаимодействия был разработан *адгезиометрический метод биотестирования*, который является ключевым моментом во всем методологическом подходе к выделению и изучению МГТБ.

Надмолекулярные структуры межклеточного пространства – ультраструктуры МК, ВКМ, адгезионные сайты, ПМ могут проявлять свойства «квасиупругого» тела. Это означает, что при кратковременном деформационном воздействии, оказываемом на ткань, они не разрушаются, а могут восстанавливать свою архитектуру. При дальнейших деформациях эти структуры все же разрушаются, но обнаруживают при этом определенную иерархичность [16–19]. Так, например, было показано, что при перфузии печени *in situ* физиологическим раствором при повышенном (10 мм. рт. ст.) давлении мембраны клеток расходились, образуя широкие просветы в области простого соединения, но с сохранением адгезивных взаимодействий в определенных высокоадгезивных участках – ВАУ. Следует отметить, что в этих условиях сохранялись также контактные взаимодействия в других зонах ультраструктур МК – десмосомах, плотных и щелевых соединениях. На электронномикроскопических снимках можно было оценить протяженность участков расхождения плазмолемм и углы раскрытия, образованные краями такого участка и поверхностью интактной клеточной мембраны.

Метод биотестирования был специально разработан для идентификации биорегуляторов данной группы [20, 21]. Он характеризует вязкоупругие свойства ткани в условиях стандартного деформационного воздействия, которые могут изменяться при воздействии фракций белков, полученных в процессе выделения МГТБ, а также позволяет изучить дозовую зависимость их мембранотропной активности.

При разработке метода биотестирования было показано, что в ткани печени при ее перфузии бескальциевым физраствором серьезно нарушаются межклеточные адгезионные взаимодействия. Это подтверждалось электронномикроскопическим исследованием – было обнаружено нарушение ряда ультраструктур МК, в том числе простого соединения [19] – а также демонстрацией восстановления механической сцепленности клеток [22].

Если в дальнейшем ткань печени с предварительно ослабленными адгезионными контактами культивировали в питательной среде с добавлением жидкости, вымытой из печени перфузией бескальциевым раствором, и ионов кальция, то механическая сцепленность клеток восстанавливалась и приближалась к таковой в нативной печени.

Кроме того, было показано, что добавление такого перфузата и ионов кальция способствуют выделению в два раза меньшего количества клеток из ткани печени с предварительно ослабленными адгезионными взаимодействиями в условиях сдвиговой деформации – то есть, адгезионные контактные взаимодействия восстанавливаются [4, 5].

Таким образом, на этом этапе исследования был разработан метод биотестирования адгезивных белков, который основывался на восстановлении адгезионных взаимодействий в ткани за счет добавления ионов кальция и молекул адгезии. Позже этот метод был модифицирован и в таком виде он используется в настоящее время для биотестирования МГТБ.

Механизм, лежащий в основе метода биотестирования, реализуется следующим образом. В условиях стандартного деформационного воздействия на ткань печени часть клеток может остаться целыми, а часть – разрушиться с

выделением клеточных ядер. Очевидно, что количество выделившихся целых клеток и клеточных ядер будет определяться вязкоупругими свойствами ПМ, макромолекулярных структур межклеточного пространства, состоянием цитоплазмы и цитоскелета клетки. ПМ является структурой, вязкоупругие свойства которой постоянно изменяются за счет непрерывно протекающих лигандо-рецепторных взаимодействий. При увеличении вязкоупругих свойств ПМ, которое достигается, например, при воздействии биорегуляторов, в условиях сдвиговой деформации значительное количество клеток, подобно упругим шарикам, может «проскользнуть» в зазор дезинтегратора без разрыва ПМ клетки.

Напротив, при уменьшении вязкоупругих свойств ПМ, после дезинтеграции фрагмента ткани количество целых клеток значительно снижается из-за их разрушения как шариков с жесткими оболочками, а количество выделившихся клеточных ядер соответственно увеличивается [21, 23]. Исходя из вышеописанного механизма и ранее упомянутых данных о важности роли клеточной адгезии и межклеточного пространства, можно сделать вывод: для проявления МГТБ своего специфического биологического действия необходимо сохранение в применяемых моделях структуры ткани (к примеру, использование органотипического культивирования). Действительно, было установлено, что мембранотропная активность МГТБ проявлялась только в условиях сохранения целостности межклеточного пространства ткани. Например, в работе [24] наряду с влиянием биорегуляторов на проницаемость клеточных мембран было показано полное отсутствие мембранотропного эффекта на моделях суспензионных культур гепатоцитов, а также органной культуры печени млекопитающих, предварительно перфузированной физиологическим раствором.

Для мембранотропной активности биорегуляторов данной группы характерен полимодальный тип дозовой зависимости, причем всегда отмечается присутствие экстремумов в области СМД [1, 21, 25]. Из-за нелинейного характера дозовой зависимости МГТБ не представляется возможным применить понятие единицы активности для оценки их активности. Однако следует отметить следующее: активность биологически активных пептидов, входящих в МГТБ, по

мере очистки могла увеличиваться, а в отдельных случаях, наоборот, уменьшаться. Как показали результаты исследования МГТБ, выделенных из тканей глаза, на активность пептидов оказывают влияние другие белки, входящие в состав биорегуляторов – белки-модуляторы [26, 27].

Эти результаты исследований были использованы при разработке экспериментальных моделей для изучения активности МГТБ. Было разработано два метода биотестирования.

Первый метод, который традиционно применялся при исследовании МГТБ, основан на оценке параметра, характеризующего вязкоупругие свойства ПМ клеток печени или легкого мыши при воздействии растворов МГТБ в различных концентрациях. Этим методом изучали дозозависимую зависимость мембранотропной активности биорегуляторов. При графическом изображении данной зависимости наблюдается также полимодальная зависимость мембранотропной активности от времени инкубации. Учесть оба фактора – время и концентрацию, от которых зависит мембранотропная активность, в одном эксперименте невозможно. Поэтому был разработан второй метод – модификация первого, в которой при определении мембранотропной активности учитывались как ее зависимость от концентрации, так и от времени инкубации органной культуры печени.

Второй метод позволяет изучать мембранотропную активность раствора биорегулятора в любой концентрации, в том числе, в состоянии «мнимых растворов». Это делает его уникальным для проведения ряда исследований оценки мембранотропной активности исследуемых растворов биорегуляторов. Его основным отличием от первого метода является возможность изучить процесс колебания параметра, отражающего вязкоупругие свойства ткани на протяжении определенного времени при строго фиксированной дозе исследуемого вещества. В этом методе принципиальным является установление самого факта наличия мембранотропной активности исследуемого вещества в определенной дозе. Этот метод необходим для определения присутствия вещества в исследуемых растворах, получаемых в процессе выделения и очистки биорегуляторов, к примеру, при исследовании отдельных ВЭЖХ-фракций.

Роль макромолекулярных структур клеточной адгезии в возникновении опухолей

В 1940-х годах было обнаружено, что клеточная адгезия нарушена в тканях опухолей [28]. Электронномикроскопические исследования на моделях перевиваемых гепатом показали, что во всех гепатомах были нарушены адгезионные взаимодействия в области простого соединения, при сохранении плотного соединения. В быстрорастущих гепатомах были обнаружены наибольшие расхождения клеточных поверхностей в зоне простого соединения, утрата специализированных ультраструктур МК [3, 29]. Корреляцию между отдельными этапами бластомогенеза и изменением свойств МК обнаружили и другие исследователи. На основании анализа полученных результатов было высказано предположение о связи изменений в структуре и функциях межклеточных контактов опухолевых клеток с автономностью их размножения, способностью к инвазии и метастазированию [29–31].

Особый интерес вызвали исследования межклеточных контактов гепатоцитов при индукции опухолей печени гепатоканцерогеном [32]. Уменьшение сцепленности гепатоцитов у экспериментальных животных, подвергшихся воздействию гепатоканцерогена, наблюдали дважды: первый раз - в раннем латентном периоде, до появления морфологических признаков опухолевой трансформации, второй - на поздних этапах индуцированного бластомогенеза, в период формирования бластом. Эти биофизические исследования были подтверждены данными о строении межклеточного пространства, полученными при помощи электронной микроскопии. Было показано увеличение расстояния между клеточными мембранами в зоне простого соединения клеток гепатоцитов животных при индуцированном гепатобластомогенезе [32].

Исследование адгезивных свойств клеточных мембран было продолжено на модели спонтанного гепатобластомогенеза *in vivo*. Оно проводилось на двух инбредных линиях мышей: генетически предрасположенных к спонтанному бластомогенезу (СВА), и устойчивых по этому признаку (С57В1) [33–35]. Было установлено, что адгезионные взаимодействия между гепатоцитами у обеих линий резко отличается в течение всего постнатального развития [36]. У мышей линии

C57Bl она возрастает приблизительно в 3 раза к первому месяцу после рождения и затем практически не меняется в течение всей жизни. У мышей линии CBA величина силы сцепленности гепатоцитов меньше, и остается постоянной на протяжении эмбрионального и всего постнатального развития вплоть до образования гепатом. Образование гепатом у мышей (самцов) линии CBA происходит к 1,5 - 2 годам жизни. Именно в этот период у них наблюдается уменьшение силы сцепления между гепатоцитами как в самой опухоли, так и в ткани, непосредственно окружающей опухоль, а также в ткани печени особей, у которых опухоль не возникла. С помощью методов электронной микроскопии было показано, что МК гепатоцитов мышей этих линий отличаются по числу и свойствам высокоадгезивных участков (BAУ) простого соединения [19]. В этой работе обнаружилось, что сила сцепленности гепатоцитов и количество BAУ у мышей CBA в 4 раза меньше, чем у мышей C57Bl. Суммируя полученные результаты, авторы работы сделали вывод, что предрасположенность ткани к опухолевой трансформации коррелирует с особым состоянием межклеточных контактов, характеризуемым, как нестабильное в зоне простого соединения. Эта нестабильность, в первую очередь, зависит от количества и физико-химических свойств BAУ [35]. Полное подтверждение этих важных заключений о принципиальной роли макромолекулярных структур межклеточного пространства в зоне простого соединения при развитии опухолей было получено при сравнительном исследовании мышей линии A, предрасположенной к спонтанному бластомогенезу в легких, и линии C57Bl, устойчивой по этому признаку [33].

Эти работы получили дальнейшее развитие при исследовании клеточной адгезии в печени у мышей высокорактовой линии CBA и низкорактовой линии C57Bl. В качестве объектов исследования были использованы МГТБ, выделенные из печени мышей обеих линий, а также биорегулятор данной группы, выделенный из сыворотки крови быка. В результате было показано, что у мышей линии CBA на поздних стадиях эмбриогенеза и раннем постнатальном периоде в органе-мишени происходит нарушение как минимум двух механизмов клеточной адгезии – опосредованных МГТБ, выделенным из печени, а также сывороточным МГТБ [37].

Было установлено, что сывороточный биорегулятор в эмбриогенезе у млекопитающих присутствует в открытом состоянии, а при рождении инактивируется из-за образования комплекса с белком-модулятором, и в таком виде присутствует в течение всего постнатального периода. Так, переход в неактивную форму сывороточного МГТБ был продемонстрирован для линии мышей C57Bl. У мышей линии CBA такой комплекс не образовывался, и сывороточный биорегулятор пребывал в активном состоянии – оказывал влияние на клеточную адгезию и пролиферацию клеток печени в течение всего постнатального периода.

Что касается молекулярного механизма адгезии, опосредованного МГТБ, выделенных из печени мышей обеих линий, то было показано, что она была полностью нарушена у мышей линии CBA задолго до образования blastom. Применяв экспериментальный подход, разработанный для выделения и очистки МГТБ, из печени мышей данной линии не удалось получить активные биорегуляторы данной группы. В то же время из печени мышей C57Bl были получены биорегуляторы, проявляющие характерную мембранотропную активность. Следует отметить, что биорегулятор, выделенный из печени мышей C57Bl, ингибировал пролиферацию эмбриональных гепатоцитов мышей этой линии, а также гепатоцитов эмбриональной печени мышей CBA. Фракции, аналогично полученные из печени мышей CBA, проявляли также ингибирующее действие на пролиферацию гепатоцитов мышей обеих линий. Полученные в этом исследовании результаты показали, что задолго до образования blastom в печени мышей высокоразвитой линии наблюдается нарушение механизмов клеточной адгезии, опосредованных МГТБ.

1.2 Физико-химические свойства и особенности строения МГТБ

К настоящему моменту обнаружен целый ряд специфических физико-химических свойств, позволяющих описать и выделить МГТБ в отдельную группу. В целом состав МГТБ сложен, но за проявление ими биологической активности

ответственна белковая компонента [27]. В ее состав входят небольшие пептиды (мол. масса не более 10 кДа), проявляющие мембранотропную активность, а также белки, оказывающие влияние на активность первых, названные белками-модуляторами [26; 38].

Методом кругового дихроизма (КД) было показано наличие в растворе пептидной компоненты МГТБ вторичных белковых структур. Относительный состав данных структур характеризуется преимущественным содержанием β -структур и статистического клубка и относительно малым содержанием α -спиралей [1]. Кроме этого, для МГТБ характерно формирование в водных растворах крупных ассоциатов. Их исследование методами лазерной корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии обнаружило формирование МГТБ крупных (до 200 нм) наноразмерных частиц [39–43]. Эти величины выходят за рамки известных значений для наночастиц, образующихся в белковых растворах, причем они описаны только в концентрированных растворах. Но для МГТБ образование подобных частиц наблюдалось даже в небольших концентрациях – порядка 0,1 мг/мл [41–43].

Важным обстоятельством, связанным с вышеописанным свойством МГТБ, оказалась связь образования ими наноразмерных частиц с проявлением биологической активности биорегулятора в области сверхмалых доз. При исследовании МГТБ, выделенного из пигментного эпителия глаза быка, была показана зависимость между проявлением активности в СМД и наноразмерным состоянием в растворе [2, 27]. Аминокислотный анализ пептидно-белковой компоненты биорегуляторов данной группы показал, что помимо значительного количества остатков глицина, они содержат также остатки серина и дикарбоновых аминокислот, и практически не содержат остатков ароматических аминокислот [21]. Подобный аминокислотный состав характерен для углеводсодержащих белков – гликопротеинов [44, 45].

Данные углеводного анализа показали, что в состав МГТБ входят остатки маннозы и N-ацетилглюкозамина [1]. Тем не менее, в настоящее время углеводная компонента МГТБ остаётся малоизученной. Следует отметить, что в состав

биорегуляторов данной группы входят ионы Ca^{2+} [27]. Методом афинной хроматографии было показано, что в основе образования пептидно-белковой части МГТБ лежит углевод-белковое взаимодействие, причем в качестве лектина выступает белок – модулятор, который «узнает» остатки маннозы гликопептидов [27]. Для пептида, входящего в состав сывороточного МГТБ, ближайшими гомологами оказались адреномедуллины – белки, продуцируемые эндотелием сосудов [46]. Белки-модуляторы были идентифицированы для сывороточного МГТБ и для пигментного эпителия глаза как две малоизученные изоформы сывороточного альбумина [27]. Восстановление комплекса пептидной компоненты с белком-модулятором для изученных МГТБ приводило к изменению проявляемых биологических свойств. В случае сывороточного МГТБ наблюдали полное ингибирование активности пептида; для МГТБ пигментного эпителия – выраженное восстановление протекторного действия на ткань пигментного эпителия в СМД [26].

Экспериментально было установлено, что при высаливании тканевых экстрактов сульфатом аммония биорегулятор частично разрушается, и белок-инактиватор сывороточного МГТБ переходит в осадок, а оставшиеся компоненты биорегулятора остаются в растворенном состоянии. В дальнейшем инактиватор был выделен из сыворотки крови крупного рогатого скота, очищен и охарактеризован. Он представлял собой кислый белок ($\text{pI} = 3,9$) с молекулярной массой 67 кДа, первичная структура которого проявляла высокую степень гомологии с сывороточным альбумином быка. По данным секвенирования, этот белок представлял собой одну из изоформ сывороточного альбумина [46]. В образовании комплекса «МГТБ-инактиватор» значительную роль играют ионы Ca^{2+} . Комплекс может быть разрушен при действии Ca^{2+} -хелатирующих агентов (ЭДТА, ЭГТА), изменении ионной силы раствора, но не в условиях электрофоретического разделения. Белки и пептиды, входящие в состав сывороточного биорегулятора, можно вновь соединить в биологически неактивный комплекс в присутствии ионов Ca^{2+} [24].

Предположительно, взаимодействие биорегулятора с белком-инактиватором является своеобразным механизмом регуляции его биологической активности в развитии. Подобный механизм был идентифицирован для некоторых цитокинов, функционирование которых в организме находится под контролем растворимых (циркулирующих в сыворотке крови) рецепторов, антагонистов рецепторов, а также других связывающих цитокины белков, которые полностью могут блокировать их биологическую активность [47].

1.3 Специфическая биологическая активность МГТБ

Первые эксперименты, в которых изучали специфическую активность МГТБ, были проведены с биорегулятором, выделенным из сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) [48]. Авторы изучали влияние данного биорегулятора на рост и клонирование трансформированных клеток млекопитающих (фибробластов) при культивировании *in vitro*. Было показано, что биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, в СМД стимулировал пролиферацию, адгезию, усиливал клоногенность этих клеток. В эмбриональном периоде развития теплокровных животных этот МГТБ находится в сыворотке крови в активном состоянии, а далее он переходит в неактивное состояние за счет взаимодействия с другим белком сыворотки крови – белком-инактиватором. В таком неактивном состоянии сывороточный МГТБ пребывает во всем постнатальном периоде [46].

Однако далее долгое время для остальных МГТБ не удавалось подобрать соответствующие экспериментальные модели клеточных культур. Поэтому были предприняты новые попытки в разработке других экспериментальных моделей *in vitro*. При этом были выявлены условия, соблюдение которых было необходимо для проявления специфической активности МГТБ, а именно: сохранения в ткани адгезионных взаимодействий между клетками, а также сохранение целостности надмолекулярных структур межклеточного пространства [20, 23, 24]. Стало понятным, что наиболее подходящими экспериментальными моделями являются органотипические культуры ткани, в которых сохранена структура ткани данного

органа и межклеточное пространство. Одной из таких моделей явилась культура заднего отдела глаза позвоночных животных, разработанная для изучения МГТБ, выделенных из тканей сетчатки и пигментного эпителия глаза [25]. Наиболее убедительно это было показано при исследовании активности биорегуляторов, выделенных из нейральной сетчатки и пигментного эпителия – тканей, имеющих общее происхождение в эмбриогенезе, связанных функционально и метаболически. Было показано, что биорегуляторы, выделенные из нейральной сетчатки и пигментного эпителия глаза быка, на модели заднего отдела глаза тритона *in vitro* проявляли тканеспецифическое протекторное действие. Тем не менее, биологическое действие обоих биорегуляторов различалось: МГТБ пигментного эпителия вызывал увеличение жизнеспособности клеток сетчатки – биполяров, мюллеровской глии; МГТБ нейральной сетчатки оказывал влияние на клетки мюллеровской глии, причем его протекторное действие отличалось от действия биорегулятора пигментного эпителия [25]. В этом исследовании на модели органотипического культивирования пигментного эпителия было отмечено влияние данного биорегулятора на уровень и распределение пигмента в клетках, что отражало его способность оказывать влияние на пролиферацию и дифференцировку в клетках этой ткани. Авторы исследования предположили, что поддержание жизнеспособности клеток нейральной сетчатки в присутствии МГТБ пигментного эпителия опосредовано тканеспецифическим влиянием этого биорегулятора собственно на пигментный эпителий. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные при отдельном культивировании нейральной сетчатки и пигментного эпителия. В этих условиях одновременно наблюдалось как значительное ухудшение жизнеспособности клеток сетчатки, так и исчезновение протекторного действия МГТБ пигментного эпителия на сетчатку. Позже удалось разделить биорегулятор пигментного эпителия на отдельные компоненты – пептидную и белковую, и изучить отдельно их активность [27]. В этих исследованиях была продемонстрирована роль МГТБ как «тонких настройщиков органо-тканевого гомеостаза» [25].

Для исследования МГТБ, выделенного из хрусталика глаза млекопитающих, позже была разработана культура целых хрусталиков позвоночных животных [2, 49]. На этих моделях было установлено, что МГТБ оказывают влияние на дифференцировку, увеличивают жизнеспособность клеток при культивировании, способствуют сохранению структуры ткани и поддерживают в ней межклеточные адгезионные взаимодействия. В этих исследованиях была продемонстрирована тканеспецифичность биологического действия МГТБ, а также отсутствие видовой специфичности. Так, например, биорегулятор, выделенный из хрусталика глаза быка, поддерживал прозрачность хрусталиков глаз как быка, так и лягушки, крысы [2].

В настоящее время МГТБ обнаружены также в роговице и склере глаза млекопитающих. Они представляют собой сходные по физико-химическим свойствам пептидно-белковые комплексы, проявляющие активность в СМД, которая характеризуется наличием тканевой, но не видовой специфичности. Эти МГТБ, выделенные из тканей глаза, были изучены весьма подробно на различных экспериментальных моделях как *in vitro*, так и *in vivo*. Результаты этих исследований представлены далее.

Органотипическое культивирование тканей как модель исследования специфической активности МГТБ

В результате дальнейшего исследования специфической активности МГТБ было обнаружено, что оптимальным условиям для ее изучения *in vitro* соответствует органотипический метод культивирования. Наиболее удобной моделью в данном случае *in vitro* является роллерное органотипическое культивирование тканей позвоночных животных. Следует отметить, что метод роллерного органотипического культивирования тканей менее распространен по сравнению с методом роллерного клеточного культивирования. Как уже указывалось выше, впервые роллерное клеточное культивирование было предпринято в 50-60-е годы XX века на отдельных клетках сетчатки глаза куриных эмбрионов [11, 50, 51]. Значительно позже был впервые применен метод

роллерного органотипического культивирования целых тканей – а именно, при исследовании ткани мозга млекопитающих для биотестирования ряда цитокинов [52]. Данный метод был также использован при культивировании сетчатки взрослых тритонов с целью обнаружения ее клеточных источников регенерации [53]. Было показано, что в данных условиях культивирования происходило накопление малодифференцированных клеток, которые активно пролиферировали и были отнесены к клеточным источникам регенерации в этой ткани.

В связи с этим были разработаны органотипические культуры таких тканей как печень, предстательная железа, кожа, регенерат хвоста тритона и даже культивирование целого глаза [54–56]. Поскольку активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности [21, 25, 55–60], эксперименты были проведены, в основном, на органных культурах тканей хвостатых амфибий (тритон *Pleurodeles waltl*). Это связано с тем, что ткани взрослых особей млекопитающих плохо переживают условия культивирования *in vitro*, а ткани низших позвоночных требуют меньшей температуры среды и соответственно менее подвержены деградации в процессе культивирования и не требуют внесения дополнительных веществ в среду для поддержания своей жизнеспособности. При использовании роллерного способа культивирования было изучено действие в СМД биорегуляторов данной группы, выделенных из различных тканей млекопитающих, в том числе тканей глаза, а также некоторых желез и их секретов [25, 57–60]. Эти исследования были проведены на органотипических культурах соответствующих тканей тритона, а в некоторых случаях – и на тканях млекопитающих.

Большое исследование было проведено на роллерной органотипической культуре роговицы глаза тритона. Методом радиоавтографии было установлено, что МГТБ роговицы стимулирует пролиферацию клеток эпителия роговицы тритона в ходе ранозаживления после нанесения экспериментальной травмы *in vivo* [61]. Кроме того, был изучен механизм, лежащий в основе стимуляции МГТБ процессов восстановления и репарации. На моделях роллерного органотипического культивирования целых роговиц глаза позвоночных животных

(тритона, крысы) исследования проводили в различных условиях – с содержанием или отсутствием в роговице лимбальной области, а также стационарно или при ротации. Было продемонстрировано, что МГТБ, выделенный из роговицы глаза быка, дополнительно активировал клеточные источники регенерации (лимбальную область) и таким образом способствовал поддержанию структуры роговицы и жизнеспособности клеток [57, 61].

МГТБ были также обнаружены в склере, радужке, стекловидном и цилиарном теле. Они представляли собой пептидно-белковые комплексы, в которых пептиды с мол. массами около 10 000 Да проявляли характерную для МГТБ мембранотропную активность в СМД. Белки – члены суперсемейства сывороточного альбумина в составе этих МГТБ выполняли функцию модуляторов мембранотропной активности пептидов [60]. В МГТБ склеры были показаны и характерные физико-химические свойства: согласно данным лазерной корреляционной спектроскопии этот биорегулятор в водных растворах присутствовал в виде наноразмерных частиц ($54,30 \pm 4,74$ нм), вторичная структура компонентов его пептидно-белковой части представлена, в основном, β -структурами и статистическим клубком [52].

На экспериментальных моделях роллерных культур целого глаза и его изолированной склеральной оболочки, а также стационарной культуры заднего отдела глаза тритона *Pleurodeles waltl*, было показано, что биорегулятор, выделенный из склеры глаза быка, в СМД оказывает протекторное действие на культивируемую ткань склеры. Оно выражалось в увеличении жизнеспособности фибробластов, поддержании пространственной организации волокон коллагена. Так, например, на модели роллерного органотипического культивирования целого глаза тритона *Pleurodeles waltl* было показано, что добавление МГТБ склеры в культуральную среду способствует увеличению жизнеспособности фибробластов склеры приблизительно в четыре раза. Аналогично проведенное исследование жизнеспособности клеток на модели стационарного (на фильтрах) органотипического культивирования склеры в составе заднего отдела глаза тритона показало ее увеличение приблизительно в два раза по сравнению с

контролем [54, 62]. Кроме того, биорегулятор оказывал протекторное действие на сосудистую оболочку и пигментный эпителий, способствовал сохранению адгезионных взаимодействий между этими тканями и склерой и поддержанию целостности их структуры. Таким образом, удалось выявить эффект исследуемого биорегулятора на жизнеспособность клеток, состояние клеточной дифференцировки и адгезионных взаимодействий не только в ткани склеры, но и в прилежащих к ней тканях.

Для изучения специфической биологической активности МГТБ, выделенных из печени, желчи и сыворотки крови млекопитающих, была разработана новая экспериментальная модель – роллерная органная культура ткани печени тритона *in vitro*.

Известно, что печень – это орган, имеющий повышенный потенциал к регенерации. Давно показано, что при гепатэктомии – хирургическом удалении целого фрагмента печени – она способна восстанавливаться, активируя процесс пролиферации гепатоцитов [63]. В то же время культивировать *in vitro* ткань печени млекопитающих достаточно сложно ввиду их сниженной жизнеспособности. Для этого в культуральную среду обычно добавляют дополнительно различные биологически активные вещества, которые могут изменить специфическое действие МГТБ. Поэтому в качестве объекта для культивирования *in vitro* была взята ткань печени тритона *Pleurodeles waltl*.

В отличие от печени млекопитающих, в печени амфибий сохраняется кроветворение во всем постнатальном периоде. Кроме того, в печени присутствуют клетки, обладающие функцией макрофагов. Одними из них являются пигментные клетки, которые способны синтезировать меланин и располагаются как в паренхиме печени, так и в кортикальном слое. Синтез меланина у них происходит в меланосомах, и распределение в них пигмента зависит от времени года. Например, количество пигмента значительно уменьшается ко второй половине зимы и увеличивается весной и летом [64]. Пигментированные клетки печени амфибий являются аналогами купферовских клеток печени млекопитающих и функционируют как макрофаги, поглощая различные частицы, например,

микроорганизмы, вирусы, а также осуществляют детоксикацию различных ксенобиотиков [65]. Эти клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток и отличаются от других фагоцитов позвоночных тем, что способны синтезировать меланин в меланосомах, но, в то же время, они не являются меланоцитами, происходящими из клеток нервного гребня [65]. Обнаружены также клетки, не содержащие пигмент, но обладающие морфологией макрофагов [66]. Предполагается, что они могут также выполнять защитную функцию, поглощая макрочастицы, в том числе некротические клетки крови, приобретая специфическое темное окрашивание.

В исследованиях МГТБ для оценки состояния ткани печени тритона определяли следующие параметры: площадь кластеров пигментированных клеток и количество митозов в клетках кортикальной области. Согласно данным литературы, эти параметры отражают способность ткани печени амфибий реагировать на повреждающие воздействия [67].

Биорегулятор печени способствовал увеличению площади кластеров пигментированных клеток печени, но в то же время угнетал пролиферативную активность соединительно-тканых клеток в краевой зоне, по сравнению с контролем; сывороточный биорегулятор стимулировал пролиферацию соединительно-тканых клеток в краевой зоне, но не способствовал увеличению площади кластеров пигментированных клеток печени тритона по сравнению с контролем [68].

Таким образом, на данной модели было показано, что МГТБ, выделенный из печени млекопитающих, активирует пигментированные клетки в печени тритона, которые выполняют у амфибий защитную функцию. В связи с этим, было высказано предположение о том, что данный биорегулятор может проявлять гепатопротекторные свойства у млекопитающих.

Следует также отметить, что МГТБ были обнаружены и в секретах желез млекопитающих, например, в секретах молочной и предстательной желез [69]. На роллерной органотипической культуре предстательных желез мыши *in vitro* было

показано, что биорегулятор, выделенный из предстательной железы быка, стимулирует образование секрета в культивируемом органе.

Ряд МГТБ, выделенных из тканей животных, изучались на экспериментальных моделях *in vivo*. В качестве примера можно привести исследование ранозаживляющего действия сывороточного биорегулятора на модели экспериментальной кожной раны у мышей. В этой работе было показано, что обработка кожной раны у мышей раствором сывороточного МГТБ вызывала эпиморфную регенерацию в области травмы, что выражалось в полном восстановлении структуры ткани [70, 71].

В экспериментах на роговице глаза кролика *in vivo* было продемонстрировано ранозаживляющее действие МГТБ, выделенных из сыворотки крови и из роговицы глаза быка. Было показано, что наиболее эффективно оба препарата действовали при последовательной инстилляции в глаза животных с экспериментальной травмой роговицы [72].

На экспериментальной модели травмы сустава у кролика *in vivo* было показано, что сывороточный биорегулятор в СМД стимулирует полное восстановление поврежденной хрящевой ткани в отличие от контрольной серии, животным в которой вводили физиологический раствор [73].

На модели экспериментально индуцированного диабета второго рода у крыс было показано, что при приеме животными раствора в СМД биорегулятора, выделенного из поджелудочной железы быка, восстанавливалась функция поджелудочной железы [74].

Исследование специфической активности биорегулятора, выделенного из тимуса быка, показало, что данный биорегулятор оказывает влияние на активность специфических Т-лимфоцитов, активируя клеточный, в том числе противоопухолевый, иммунитет [75].

Таким образом, суммируя результаты проведенного исследования специфической активности на различных экспериментальных моделях, удалось продемонстрировать способность МГТБ тканеспецифично стимулировать

восстановление и регенерацию, а также оказывать протекторное действие на поврежденные ткани позвоночных животных.

МГТБ тканей растений

МГТБ были обнаружены в тканях растений. Впервые было показано наличие биорегуляторов данной группы в таких растениях, как подорожник большой, лук репчатый, чеснок, укроп пахучий, алоэ древовидное, кориандр посевной и лимон. Полученные биорегуляторы по физико-химическим свойствам оказались сходны с МГТБ, ранее выделенными из тканей животных: они были растворимы в насыщенном растворе сернокислого аммония, в их состав входят биологически активные пептиды. Один из таких пептидов – входящий в состав МГТБ лука репчатого, был выделен и идентифицирован: анализ его первичной структуры показал, что это – ранее не идентифицированный пептид [76]. В водных растворах биорегуляторы присутствуют в виде наноразмерных частиц (до 110 нм). Растительные МГТБ проявляют мембранотропную активность, которая характеризуется полимодальной дозовой зависимостью и проявлением в концентрациях, соответствующих 10^{-4} – 10^{-15} мг белка/мл.

Для биорегуляторов, выделенных из подорожника и алоэ, показано свойственное данным растениям протекторное действие на ткань кожи. Это было продемонстрировано на двух моделях. На модели роллерного органного культивирования кожи тритона (*Pleurodeles waltl*) *in vitro* действие выражалось в поддержании нормальной морфологии ткани кожи тритона, секреции желез и увеличении жизнеспособности клеток по сравнению с контролем [68]. На модели экспериментальной раны у мышей *in vivo* также было продемонстрировано протекторное действие на ткань кожи. В сравнении с контрольной группой животных, рану у которых обрабатывали физ. раствором, у животных, на которых воздействовали растворами растительных МГТБ в СМД, наблюдали восстановление структуры кожи [77]. В результате этих исследований было показано, что МГТБ, выделенные из лекарственных растений, проявляют

биологическое действие, отражающее фармакологические свойства этого растения.

Интересной задачей было обнаружение биологической активности на растениях. Показано, что биорегуляторы, выделенные из лука репчатого и укропа пахучего, в концентрациях, соответствующих 10^{-14} и 10^{-12} мг белка/мл, оказывают влияние на рост и развитие семян ряда растений, причем характер этого действия может быть как ингибирующим, так и стимулирующим [78].

Более того, при исследовании биорегулятора, выделенного из чеснока посевного, было отмечено его влияние на защитные механизмы растений. На модели экспериментального заражения листьев риса пирикулярриозом (гриб *Magnaporthe grisea*) было показано протекторное действие (доля незараженных листьев увеличилась с 15 % в контроле до 75 % в опыте). При этом биорегулятор не подавлял прорастание спор у самого возбудителя *M. grisea*, что позволяет сделать вывод о том, что показанное биологическое действие обусловлено именно активацией защитных реакций растения. Аналогичным образом испытывая в СМД пептид, выделенный из чеснока посевного, против другого грибного патогена – возбудителя гельминтоспориоза *Bipolaris sorokiniana* – на листьях пшеницы и ячменя, также наблюдали ингибирование развития болезни при отсутствии прямого действия исследуемого вещества на возбудитель. На основании полученных данных авторы этих исследований высказали предположение о том, что на основе растительных биорегуляторов могут быть разработаны препараты, которые перспективны для применения в сельском хозяйстве [79].

Локализация МГТБ в тканях позвоночных животных и растений.

Важным моментом при исследовании МГТБ явилось установление локализации данных биорегуляторов в тканях позвоночных животных и растений. Это исследование проводили с помощью методов иммуногистохимии. Поликлональные антисыворотки получали по методу Гослинга путем иммунизации кроликов фракциями биорегуляторов, очищенных после изоэлектрофокусирования [80]. Молодых кроликов иммунизировали многократно

небольшими объемами концентрированных растворов соответствующих фракций биорегуляторов. Только при таком способе иммунизации удалось получить поликлональные сыворотки к ряду биорегуляторов данной группы. Локализацию МГТБ, выделенных из животных тканей, изучали в тканях крысы и тритона, используя иммуногистохимическую реакцию с использованием вторичных FITC-конъюгированных антител.

Впервые с помощью такого подхода удалось определить локализацию биорегулятора, выделенного из нейральной сетчатки глаза быка, в ткани сетчатки крысы [25]. Было показано, что этот биорегулятор локализуется на поверхности отростков фоторецепторов.

При исследовании биорегулятора, выделенного из печени крысы, было показано, что он локализуется в области синусоида печени [39]. Биорегулятор, выделенный из роговицы, был обнаружен в межклеточном пространстве эпителия и эндотелия роговицы [40]. Для МГТБ, выделенных из молока и из ткани предстательной железы, было установлено, что они имеют внеклеточную локализацию и обнаруживаются в стенках протоков данных желез [41].

С помощью аналогичного иммунохимического подхода была изучена внеклеточная локализация растительных МГТБ. Было продемонстрировано, что биорегулятор, выделенный из подорожника, локализован в межклеточном пространстве ткани этого растения [81]. Биорегулятор, выделенный из луковиц чеснока, в листьях луковицы чеснока локализован на поверхности клеток губчатого мезофилла и эпидермиса [79, 82].

Эти данные показывают, что растительные МГТБ, очевидно, играют принципиальную роль в процессах роста и развития растения.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей, которые являлись источником их выделения. Эти результаты согласуются с данными, свидетельствующими о проявлении биорегуляторами данной группы мембранотропной и адгезионной активности [20; 39–41, 83].

Механизмы, лежащие в основе биологического действия МГТБ.

Результаты исследования биологической активности МГТБ показывают, что эти биорегуляторы стимулируют восстановительные и репаративные процессы в патологически измененных тканях.

Как известно, процесс регенерации может осуществляться по двум основным механизмам: за счет дополнительной активации КИР, представляющих собой мультипотентные стволовые клетки (например, стволовая ниша волосяного фолликула – зона «bulge», а также расположенная в его корне дермальная папилла [84]). Мультипотентные клетки, расположенные в этих зонах, способны в результате несимметричного деления образовывать стволовую клетку и вторую, которая вступает в дальнейшую дифференцировку и приводит к образованию прогениторных клеток. Эти клетки способны в дальнейшем к пролиферации и дифференцировке во все клетки данной ткани для образования (восстановления) гистоструктуры органа. Несмотря на активное исследование механизмов, лежащих в основе пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток, сигнальные молекулы, определяющие их ход и направленность, изучены недостаточно.

Второй тип КИР - клетки, обладающие потенциалом к дедифференцировке, которые могут под воздействием различных регуляторных сигналов приобрести другой статус дифференцировки. Например, при воздействии воспалительных факторов находящиеся в печени млекопитающих звездчатые клетки (клетки Ито) способны к трансформации в миофибробласты. Возможна и другая ситуация, при которой возможен переход в результате дедифференцировки клеток, находящихся в дефинитивном состоянии и неспособных к пролиферации, в клетки с высоким пролиферативным пулом. В качестве примера можно привести гепатоциты взрослых особей млекопитающих, которые в условиях интоксикации или частичной гепатэктомии, дедифференцируясь, способны активно пролиферировать с восстановлением массы и гистоструктуры печени [85].

Результаты исследования биологического действия МГТБ позволяют предположить их влияние на оба типа КИР [68]. Действительно, исследование, проведенное на МГТБ, выделенном из роговицы глаза быка, показало его

способность стимулировать эпителизацию экспериментальной раны в роговице за счет дополнительной активации лимбального отдела [57, 72]. Эти данные согласуются с результатами исследования МГТБ сыворотки крови, которые показали, что данный биорегулятор не только стимулирует заживление экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo* (эпителизацию), но и полностью восстанавливает структуру ткани [81]. Очевидно, приведенные примеры указывают на способность МГТБ оказывать влияние на первый механизм стимуляции КИР – мультипотентные стволовые клетки. В то же время авторами этого исследования отмечалась возможность влияния МГТБ на второй механизм функционирования КИР, однако в настоящее время отсутствует достаточное количество экспериментальных данных для прямого доказательства этого факта.

Феномен биологического действия изучаемых веществ в сверхмалых дозах

Одним из важных свойств МГТБ является проявление ими биологической активности в СМД [1]. Действие веществ в сверхмалых (10^{-8} – 10^{-15} М) дозах является в настоящее время признанным и активно изучаемым феноменом. Многими исследователями отмечаются различия в действии веществ в высоких концентрациях и области СМД. В основном это изучено для фармацевтических препаратов, у которых в СМД может обнаруживаться противоположное, «парадоксальное» действие [86, 87], отсутствие проявления свойственных данному веществу побочных эффектов [88] либо проявление других [89]. Ввиду кажущегося противоречия подобных явлений с общепризнанным в науке пониманием физико-химических и биохимических процессов, поначалу основное внимание исследователей было сосредоточено на доказательстве существования самого феномена действия в СМД, а не обсуждению механизмов его действия. К настоящему времени сформирован ряд представлений о важных аспектах проявления действия веществ в СМД и гипотезы о механизмах подобного действия.

Так, рядом авторов показано сопутствующее биологическому действию изучаемых веществ в СМД их параллельное влияние на микровязкость и упругость

мембран клеток и органелл [17, 20, 21, 88]. Кроме этого, было показано образование в растворах веществ в СМД наноразмерных частиц [40, 90]. Было также установлено, что для проявления активности веществ в СМД необходимым фактором является наличие естественного фона электромагнитного поля, а в его отсутствие (при экспериментальном экранировании раствора от электромагнитных полей) эффект не проявляется [91].

Одним из предполагаемых ключей к пониманию механизма и особенностей действия веществ в СМД является взаимодействие молекул растворенного вещества с молекулами воды [1, 87, 90]. По мнению авторов этих работ, это взаимодействие приводит к наблюдаемому образованию наноассоциатов в растворе. Принцип образования таких структур изучен с помощью ряда оптических методов исследования, показано, что в их формировании и свойствах играют роль орто- и пара- спиновые изомеров воды [92].

В аспекте исследования МГТБ предполагается, что молекулы биорегуляторов действуют на воду, находящуюся в межклеточном пространстве тканей. Предположительно, взаимодействуя с водой с образованием надмолекулярных структур биорегуляторы данной группы участвуют в проведении регуляторных сигналов. Авторами исследований МГТБ выдвигается гипотеза о существовании общей супрамолекулярной структуры в межклеточном пространстве, состоящей из молекул МГТБ и структурированной ими воды, которая становится матрицей для передачи информационного сигнала между клетками [1]. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты исследования растворов сывороточного биорегулятора в СМД, проведенного с помощью традиционных физико-химических методов – дифференциальной сканирующей колориметрии, ИК-спектроскопии, лазерной корреляционной спектроскопии, которые показали изменения свойств воды [40]. Эти изменения можно было объяснить структурными особенностями воды в растворе биорегуляторов этой группы в низких концентрациях.

Заключение по литературному обзору

Таким образом, при исследовании МГТБ было показано, что они представляют собой пептидно-белковые комплексы со сходными физико-химическими свойствами, но различаются по специфической биологической активности. Они играют принципиальную роль в межклеточной адгезии, проявляя мембранотропную активность и поддерживая межклеточные адгезионные взаимодействия в тканях. Являясь адгезивными факторами, они оказывают влияние на все основные клеточные процессы – клеточную дифференцировку, пролиферацию, миграцию. Благодаря их внеклеточной локализации в тканях и выраженной тенденции к образованию межмолекулярных ассоциатов можно предположить, что МГТБ представляют собой новую надмолекулярную структуру межклеточного пространства, биологическое действие которой, очевидно, связано, во-первых, с поддержанием определенного позиционного расположения клеток в тканях, и во-вторых, способностью влиять на состояние воды в биологических жидкостях в организме, в первую очередь – межклеточном пространстве тканей [1].

Обнаружение МГТБ в различных тканях позвоночных животных, а также растений, предполагает присутствие этой надмолекулярной структуры также и в тканях беспозвоночных животных. Выяснению этого вопроса посвящена данная работа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались следующие реактивы:

NaCl - Реахим, хч, Россия; CaCl₂ – Serva, Германия; KCl - Реахим, хч, Россия; KH₂PO₄ - Реахим, хч, Россия; NaH₂PO₄ - Sigma, США; Na₂HPO₄ - Sigma, США; сульфат аммония - Реахим, хч, Россия; Na₂CO₃ - Реахим, хч, Россия; NaOH - Реахим, хч, Россия; NaHCO₃ - Реахим, хч, Россия; CuSO₄·5H₂O - Реахим, хч, Россия; ацетонитрил - Реахим, хч, Россия; TRIS – Serva, Германия; додецилсульфат натрия – Serva, Германия; дитиотреитол – Serva, Германия; акриламид – Sigma, США; метилен-бис-акриламид – Sigma, США; персульфат аммония – Sigma, США; TEMED (тетраметилэтилендиамин) – Sigma, США; изопропанол - Реахим, хч, Россия; трипсин – Sigma, США; уксусная кислота - Реахим, хч, Россия; глицин – Serva, Германия; метиловый спирт - Реахим, хч, Россия; трифторуксусная кислота - Реахим, хч, Россия; меркаптоэтанол - Реахим, хч, Россия; Кумасси G-250 - Eastman, США; соляная кислота - Реахим, хч, Россия; трипановый синий – Serva, Германия; этиловый спирт - Реахим, хч, Россия; ацетон - Реахим, хч, Россия; п-ксилол - Реахим, хч, Россия; США; бицинониновая кислота - Sigma, США; Sigma, США; мембранные фильтры типа «СА» с размером пор 0,22 мкм - Nalgene, США; среда 199 - Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, Россия.

Были использованы следующие приборы:

источник тока для электрофореза – PowerPac Basic (BioRad), США; прибор для вертикального электрофореза Mini vertical gel system EC120 (BioRad), США; спектрофотометр – ПЭ5400УФ (ООО Экохим), Россия; микроскоп световой – Микмед 6 СО (Ломо), Россия; роллер – Assistant RM5 (Karl Hecht KG), Германия; флуоресцентный роботизированный микроскоп BZ 9000 (Keyence) Япония, световой микроскоп – Olympus Vanox АНВТЗ, Япония; цифровая камера - Olympus U-PMТVС, Япония; КД-спектрометр - Jasco 720, Япония; рН-метр Oakton 2100 series (EUTECH Instruments), Сингапур; Ультразвуковая баня – Transsonic Digital (Elma), Швейцария, MALDI-времяпролетный масс-спектрометр с неодимовым лазером Ultraflex II (Bruker), Германия.

В работе использовали следующих экспериментальных животных:

- крысы линии Wistar (150–200 г, 155 шт., ♂);
- мыши поколения F1 C57Bl/СВА (16–20 г, 218 шт., ♂),
- тритоны *Pleurodeles waltl* (половозрелые, длина 10–12 см, ♂, 23 шт).

2.1 Получение тканевых экстрактов

Экстракт гепатопанкреаса краба получали следующим образом: замороженный гепатопанкреас подвергали экстракции при 4°C в течение 4-х часов в растворе состава (г/100 мл): NaCl – 2,92; KCl – 0,075; CaCl₂ – 0,44. Далее полученный раствор центрифугировали при 15000 g в течение 20 минут, полученный экстракт сразу же подвергали осаждению насыщенным раствором сульфата аммония.

Экстракт глохидий моллюска жемчужницы получали следующим образом: 20 взрослых особей моллюска подвергали осторожному нагреву до 20 °С до раскрытия створок раковин. После этого осуществляли смыв с внутренней поверхности особей с содержащимися внутри глохидиями. Полученный экстракт немедленно охлаждали до 4 °С и подвергали дальнейшему высаливанию сульфатом аммония.

Экстракт тканей мидий получали следующим образом: 70 взрослых (5-7 лет) особей мидий, собранных на банке бухты Биофильтров п-ова Киндо в Кандалакшском заливе (Лоухский район республики Карелия), разрезали пополам, содержимое раковин помещали в физиологический раствор состава (г/100 мл): г/100 мл): NaCl – 2,92; KCl – 0,075; CaCl₂ – 0,44 при температуре 4°C и экстрагировали в течение 3 часов. После этого полученный экстракт фильтровали через тканевой фильтр и подвергали дальнейшему высаливанию сульфатом аммония.

Выделение исследуемых фракций из культуральной среды гриба *Fusarium sambucinum* вели следующим образом: к 3л охлажденной культуральной среды добавляли 2350 г (до насыщения) сухого сульфата аммония, тщательно перемешивали, не допуская пенообразования. Полученную смесь оставляли на 7

суток при 4°C, далее подвергали центрифугированию (15000 g, 20 мин, 4°C), собирали надосадочную жидкость (супернатант) и осадок.

2.2 Получение супернатантов тканевых экстрактов

К экстракту ткани при перемешивании при комнатной температуре добавляли сульфат аммония до образования насыщенного раствора соли (78 г сухой соли на 100 г воды). Высаливание белков проводили в течение 72 часов при +4°C, после чего осажденные белки отделяли центрифугированием в течение 30 мин на скорости 15000 g при +4°C. Далее их растворяли в фосфатно-солевом буфере (0,01 М PBS, pH 7,4) и диализовали против 0,01 М PBS. Супернатанты экстрактов диализовали против дистиллированной воды (с добавлением азид натрия) для удаления низкомолекулярных примесей и сульфата аммония в течение 10 дней при +4°C с многократной сменой воды (в соотношении 1:50). В течение последних 48 часов перед снятием диализных мешков азид натрия в дистиллированную воду не добавляли. Повторно высаливали и диализовали. Полученные бессолевые супернатанты экстрактов концентрировали, используя вакуумный роторный испаритель (37°C) и сохраняли при -70°C.

2.3 Определение концентрации белка

Количественное определение белка в исследуемых фракциях осуществляли с помощью колориметрического метода с использованием бицинхонината меди при 562 нм.

Для этого готовили два раствора:

Раствор А – 1 г бицинхониновой кислоты, 2 г Na₂CO₃, 0,16 г тартрата натрия, 1 г NaOH, 0,95 г NaHCO₃ в 100 мл дистиллированной воды (pH 11,25);

Раствор Б – 0,4 г CuSO₄·5H₂O в 10 мл дистиллированной воды.

Непосредственно перед проведением опыта готовили третий раствор В, смешивая 50 мл раствора А с 1мл раствора Б. Для определения концентрации белка к 50 мкл исследуемого раствора прибавляли 1мл раствора В, инкубировали пробы 30 минут при 60°C, затем охлаждали до комнатной температуры. Поглощение

измеряли при 562 нм. Для построения калибровочной кривой вначале готовили растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрациях: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750, 1000 мкг/мл. К 50 мкл раствора БСА известной концентрации добавляли 1 мл раствора В, полученные пробы инкубировали, измеряли поглощение по описанной выше методике и строили калибровочную кривую согласно результатам измерений. По построенной калибровочной кривой определяли концентрацию белков в исследуемых растворах.

2.4 Определение мембранотропной активности при кратковременном органном культивировании печени и легкого мыши in vitro

Адгезиометрический метод определения мембранотропной активности №1

Тестирование биорегуляторов во фракциях, получаемых в процессе очистки, проводили с помощью адгезиометрического метода, специально разработанного для идентификации биологически активных в СМД биорегуляторов данной группы. Интервал активных концентраций для соответствующего биорегулятора определяли, исследуя биологическое действие его растворов, полученных при последовательном разведении исследуемой фракции в 10, 100, 1000 и более раз. Эксперименты проводили на мышах-гибридах F1 C57Bl/СВА, самцах весом 18-22 г, содержащихся в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. После декапитации животного, из печени вырезали фрагменты весом 0,5-1,0 мг, помещали по пять фрагментов ткани в пенициллиновые флаконы, содержащие 0,9 мл питательной среды 199 и 0,1 мл исследуемого раствора препарата биорегулятора, полученного при 10-кратном последовательном разбавлении изучаемой исходной фракции. В качестве контроля были исследованы органотипические культуры, которые инкубировали в 1,0 мл питательной среды 199, не содержащей биорегулятор. Культуры инкубировали в течение 2 ч при 37°С. Далее, каждый фрагмент ткани вынимали, быстро осушали на фильтровальной бумаге, взвешивали и подвергали диспергированию в специальном дезинтеграторе с зазором 50 мкм в 0,1 мл 0,1%-ного раствора трипанового синего, приготовленного на 199-й среде. Полученную суспензию клеток и клеточных ядер исследовали

микроскопически в камере Горяева, проводя подсчет клеточных ядер в определенном объеме камеры ($0,02 \text{ мм}^3$).

В каждом опыте на одну экспериментальную точку (раствор исследуемого биорегулятора в определенной концентрации, а также и в контроле) просчитывали не менее 5 фрагментов ткани. Для определения биологической активности каждого препарата проводили не менее 3-4 опытов. При этом мембранотропную активность рассчитывали по формуле:

$$Ma = 200\% - [(N_{\text{оп.}}/N_{\text{к.}}) \times 100\%],$$

где Ma – мембранотропная активность;

$N_{\text{оп.}}$ и $N_{\text{к.}}$ – количество клеточных ядер, выделившихся из 1 мг ткани, соответственно, в опыте (тканевые культуры в присутствии исследуемого биорегулятора) и в контроле (тканевые культуры без добавления исследуемого биорегулятора). Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

Адгезиометрический метод определения мембранотропной активности № 2.

Эксперименты проводили на мышах-гибридах F1 C57Bl/CBA, самцах весом 18-22 г, содержащихся в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. После декапитации животного, из печени вырезали фрагменты весом 0,5-1,0 мг, помещали по пять фрагментов ткани печени в пенициллиновые флаконы, содержащие 0,9 мл питательной среды 199 и 0,1 мл исследуемого раствора препарата биорегулятора в активной концентрации. В качестве контроля были исследованы органнне культуры печени, которые инкубировали в 0,9 мл питательной среды, содержащей 0,1 мл физиологического раствора.

Органнне культуры инкубировали в течение 20 мин при 37°C . Далее в течение интервала – 2,5 минуты приготавливали суспензии клеток и клеточных ядер путем диспергирования в специальном дезинтеграторе с зазором 50 мкм в 0,1 мл 0,1%-ного раствора трипанового синего, приготовленного на 199-й среде. Из двух фрагментов ткани: один фрагмент брали из опытной серии, а второй фрагмент из контрольной. Таким образом приготавливали не менее 10 экспериментальных пар, состоящих из фрагментов ткани опытной и контрольной серии. Затем

полученные суспензии клеток и клеточных ядер исследовали под микроскопическим контролем в камере Горяева, проводя подсчет клеточных ядер в определенном объеме камеры ($0,02 \text{ мм}^3$). Подсчет ядер проводили не позже чем 60-85 мин. от начала инкубации. Эксперименты повторяли не менее 3-х раз, используя разных животных.

Мембранотропную активность рассчитывали для каждой пары (контроль – опыт) по вышеуказанной формуле, описанной для метода №1.

2.5 Электрофорез белковых фракций в полиакриламидном геле

Электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли (толщина геля – 0,75 мм, размер 8x10 см) [93]. Окрашивание гелей проводили с помощью красителя Кумасси G-250.

Состав 15%-ного разделяющего полиакриламидного геля: мономерный раствор (массовые доли акриламида 30,8 %, бис-акриламида 2,7 %) – 7,5 мл, Трис - буфер (1,5М Трис- HCl, pH 8,8) – 3,8 мл, 10% -ный раствор додецилсульфата натрия – 0,15 мл, бидистиллированная вода – 3,6 мл, 10%-ный раствор персульфата аммония - 75 мкл, TEMED - 5 мкл. Состав концентрирующего 4%-го полиакриламидного геля: мономерный раствор - 0,44 мл, раствор буфера (0,5 М Трис - HCl, pH 6,8) - 0,83 мл, 10%-ный раствор додецилсульфата натрия - 33 мкл, бидистиллированную воду - 2,03 мл, 10%-ный раствор персульфата аммония – 16,7 мкл, TEMED – 1,7 мкл. Электродный буфер содержал: 0,025 М Трис, 0,192 М глицин и 0,1% додецилсульфат натрия (pH 8,3).

Использовались маркеры: 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 – фосфатдегидрогеназа – 36,0 кДа, овальбумин – 45,0 кДа, альбумин – 66, 0 кДа. При окрашивании гелей красителем Кумасси G-250, их сначала помещали на 10-15 мин в фиксирующий раствор (25% изопропанол, 10% уксусная кислота), а затем в раствор Кумасси (10% уксусная кислота, 0,06%

Кумасси G-250) до появления окраски. Для снятия фонового окрашивания использовали фиксирующий раствор (5% метанол, 7% уксусная кислота).

2.6 Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле

Проводили следующим образом: фрагмент геля размером около 22 мм, дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH_4HCO_3 в течение 20 мин при комнатной температуре. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив гель, прибавляли к нему 4 мкл раствора трипсина (Promega) в 0,05 М NH_4HCO_3 с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0,5 % ТФУ в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Раствор, образовавшийся над гелем, исследовали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot [94]. Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI считали определенными надежно ($p < 0,05$).

2.7 Определение вторичной структуры с помощью метода кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма в УФ-области (195-260 нм) снимали на КД-спектрометре Jasco 720 (Япония) при 20°C в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм. Скорость сканирования составила 50 нм/мин, шаг - 1 нм, накопление каждого шага - 2 сек. Концентрация исследуемого белка в водном растворе составляла 100 мкг/мл. Итоговый спектр получали по результатам усреднения данных трех сканирований и вычитания спектра базовой линии

(контроля). Содержание элементов вторичной структуры оценивали с помощью программы k2d.

2.8 Определение размеров частиц методом лазерной корреляционной спектроскопии

Эксперименты по определению гидродинамического радиуса частиц в растворах фракций выполняли методом динамического рассеивания света на приборе "Malvern Zetasizer Nano" (фирма "Malvern", Россия), при угле рассеяния 173° . Пыль из растворов удаляли путем фильтрования через мембраны "Dugapore" с диаметром пор 0,22 мкм ("Millipore"). Накопление сигнала вели до наступления сходимости автокорреляционной функции, в момент когда интегральная относительная погрешность обработки становилась равной или меньшей 10^{-4} .

2.9 Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Исследуемую фракцию объемом до 500 мкл наносили на колонку C8-4,6×250 (Биохиммак) на хроматографе Agilent 1260 (США) при $t=20^\circ\text{C}$ в градиентном растворе ацетонитрил/вода в присутствии ТФУ (0,1%). Элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин в течение 60 мин, доводя соотношение ацетонитрил-вода от 100% воды в начале до 98% AcN в конце профиля элюции. Детекцию белковых фракций проводили при длине волны 280 нм. Полученные после ВЭЖХ фракции подвергали биотестированию и при наличии биологической активности далее исследовали их физико-химические свойства. Для этого из них предварительно в вакуумной центрифуге удаляли ацетонитрил.

2.10 MALDI –TOF масс-спектрометрический анализ

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 0,5 мкл раствора образца и раствора α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20 % ацетонитриле в воде с 0,5 % ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона и в тандемном режиме (MS/MS); точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005% (50ppm), точность измеренных моноизотопных масс фрагментов была в пределах 2 Да.

2.11 Роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона in vitro

Объектом исследования были взрослые тритоны *Pleurodeles waltl* (9-12 мес, длина 10-12 см), полученные из аквариальной ИБР РАН.

Тритоны были наркотизированы в 0,1%-ном растворе MS-222. После наркотизации животных декапитировали. Изолированную печень помещали в стерильные чашки Петри (3,5 см) в бессывороточную среду для амфибий. С помощью бинокля, оснащенного источником холодного света, печень разрезали на фрагменты размером 3×3 мм, каждый фрагмент включал как паренхиму, так и соединительную ткань капсулы.

Органотипическое роллерное культивирование ткани печени тритонов проводили в следующих условиях. Среда культивирования состояла из среды 199 (70%), дистиллированной воды (30%), буфера HEPES (30 мкл на 100 мл среды), гентамицинсульфата (200 мкл на 100 мл среды) и 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки (10 мл на 100 мл среды). Перед внесением в пузырьки среда проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры модели «Millex-GV» фирмы Millipore (Ирландия) с размером пор 0,2 мкм. Полученные фрагменты печени помещали в культуральные флаконы из темного стекла объемом 10 мл. В каждый разливали по 5 мл среды. Во флаконы опытных серий в среду однократно добавляли исследуемую белковую фракцию (0,1 мл) в конечной концентрации 10^{-12} мг/мл раствора, полученной при последовательном десятикратном разбавлении исходного препарата в питательной среде 199. Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой Parafilm M и ставили в термостат.

Культивирование печени тритона проводили в темноте при температуре $19 \pm 1^\circ\text{C}$ при скорости вращения 35 об/мин в течение 3 суток. Содержание кислорода в пробирках составляло $9,1 \text{ мг/дм}^3$. Культуральную среду в течение всего срока культивирования не меняли, при этом показатели рН оставались практически неизменными.

В эксперименте, проведенном на данной модели, по изучению биологического действия восстановленного пептидно-белкового комплекса, выделенного из ткани гепатопанкреаса краба, последний приготавливали следующим образом. Аликвоты по 0,1 мл пептидсодержащих ВЭЖХ-фракций, подготовленных согласно разделу 2.9 настоящей работы, смешивали в микропробирке. Затем отбирали 0,1 мл полученной объединенной пептидной фракции и к ней добавляли 1 мл раствора фракции осадка, полученной при высаливании тканевого экстракта сульфатом аммония, из которой предварительно методом диализа была удалена соль. К данному раствору добавляли раствор CaCl_2 до достижения концентрации 10^{-3}M . Данный раствор оставляли в холодильнике на 24 часа. Затем все эти фракции были использованы в эксперименте по роллерному органотипическому культивированию печени тритона в течение трех суток.

2.12 Приготовление гистологических срезов

Для приготовления парафиновых срезов фрагменты ткани печени помещали в фиксатор Буэна, фиксировали в течение 4 часов и затем в течение 12 часов трижды отмывали 70%-ным этанолом. После этого фрагменты ткани печени дегидратировали спиртово-ксилоловой проводкой и заливали в парафин. Парафиновые блоки резали на серии срезов толщиной 4-5 мкм, которые после депарафинирования и гидратирования окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Маллори и заключали в канадский бальзам под покровное стекло.

2.13 Морфометрическая оценка ткани печени тритона

Оценку площади, занимаемой пигментированными клетками в печени тритона, проводили с помощью свободно распространяемой программы для

анализа и обработки цифровых изображений ImageJ [95]. Фотографии срезов были получены на автоматизированном флуоресцентном микроскопе Keyence BZ 9000 (Япония) с увеличением объектива 4x и разрешением конечного файла 4080×3072 пикс. Площадь пигментированных клеток оценивали в процентах от общей площади среза ткани. Для этого при помощи программы ImageJ в пикселях площадь гистологического среза печени тритона и сравнивали с полученной с помощью той же программы площадью пигментированных клеток. Для каждой экспериментальной точки просчитывали не менее 30 срезов, полученные массивы данных проверялись на нормальность распределения, в отсутствие которой для статистической обработки использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и бутстреп-анализ.

2.14 Экспериментальный фиброз печени крыс

Влияние исследуемых в работе веществ на развитие фиброза печени изучали на крысах линии Wistar. Развитие фиброза в печени крыс индуцировали с помощью введения животным гепатотоксина - тетрахлорида углерода.

В качестве контрольного фармакологического препарата в эксперименте использовался Силимар, содержащий в виде высушенного растительного экстракта действующее вещество силибин и применяющийся в медицине для лечения токсических поражений печени и при хронических гепатитах.

Экспериментальным животным проводили инъекции гепатотоксина внутривенно. В качестве гепатотоксина использовали раствор CCl_4 на оливковом масле в пропорции 1:1 по объему. Инъекции гепатотоксина проводили в объемах из расчета 0,2 мл/100 г веса животного два раза в неделю в одни и те же дни. По прошествии четырех недель инъекций доза снижали вдвое (до 0,1 мл/100 г веса животного или 0,05 мл чистого CCl_4 /100 г веса животного). Всего животные получали 16 инъекций в течение 8 недель. Через три дня после последней инъекции половина животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Остальных животных аналогичным способом выводили из эксперимента через 4 месяца после начала эксперимента. У всех выведенных из эксперимента

животных немедленно извлекали печень и фиксировали в 10% -ном формалине для последующей гистологической обработки.

2.15 Морфометрическая оценка состояния ткани печени крыс

Оценку площади, занимаемой фибротическими изменениями в печени крыс, проводили с помощью свободно распространяемой программы для анализа и обработки цифровых изображений ImageJ. Гистологические срезы окрашивались по Маллори с тем, чтобы увидеть характерную окраску коллагеновых фибротических образований на фоне здоровой паренхимы. Фотографии срезов были получены на микроскопе Keyence VZ 9000 (Япония) с увеличением объектива 20× и разрешением конечного файла 4080×3072 пикс. Фотографии затем сшивались в программе VZ Analyzer в единое изображение, позволяющее охватить всю площадь гистологического среза доли печени в указанном разрешении. Площадь фибротических изменений оценивали в процентах от общей площади среза ткани. Для этого при помощи программы ImageJ измеряли в пикселях площадь гистологического среза печени крыс и сравнивали с полученной с помощью той же программы площадью фиброзных структур, используя выделение по цветовому профилю изображения. Для каждой экспериментальной точки просчитывали не менее 50 срезов, полученные данные обрабатывались статистически с применением критерия Манна-Уитни и бутстреп-анализа.

2.16 Влияние исследуемых фракций на заживление кожной раны у мышей *in vivo*

Эксперимент проводили на мышах F1 (СВА/С57В1) самцах, весом 20-22 г. Животных разделяли на группы по 5 шт. в каждой. У каждой мыши, наркотизированной эфиром, на спине вырезали лоскут кожи, размером около 1 см². В эксперименте всегда использовали следующие варианты экспериментальных точек:

1. Контрольная группа мышей, которым наносили травму и не подвергали далее никакому воздействию;

2. Контрольная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл физ. раствора (контроль способа нанесения исследуемого препарата);

3. Опытная группа мышей, которым после нанесения травмы ежедневно наносили в область раны 100 мкл раствора изучаемой фракции.

На 11-ые сутки после нанесения ран животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом. Далее немедленно вырезали фрагменты кожи с раной и фиксировали в растворе Буэна, далее в течение 12 час трижды отмывали 70%-ным этанолом. Затем по стандартной методике фрагменты кожи заливали в парафин и приготавливали гистологические срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином по стандартной методике. Просмотр и съемку гистологических препаратов производили на микроскопе Keyence BZ 9000 (Япония).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе впервые были исследованы ткани беспозвоночных животных, с целью поиска и обнаружения в них мембранотропных пептидов, сходных по свойствам с мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами (МГТБ). Были изучены следующие объекты: гепатопанкреас краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*, моллюски пресноводная жемчужница *Margaritifera margaritifera* и мидии *Mytilus edulis*, а также среда культивирования микроскопического гриба *Fusarium s.* Изучаемые вещества выделяли из тканей по ранее разработанным методикам согласно экспериментальному подходу для изучения МГТБ. Задачами этого исследования было обнаружение в тканях беспозвоночных животных пептидов, обладающих свойствами МГТБ – специфической мембранотропной активностью с проявлением ее в СМД и наличием определенных физико-химических свойств, а также определение у них специфической биологической активности.

При исследовании специфической активности были использованы ранее применявшиеся при исследовании МГТБ экспериментальные модели – ранозаживление кожи у мышей *in vivo*, роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона *in vitro*. Кроме того, была применена модель СС1₄-индуцированного фиброза печени у крыс *in vivo*. Анализ результатов, полученных при изучении специфической биологической активности этих веществ, позволил сделать вывод о ее наличии у исследуемых веществ свойств МГТБ: они должны были бы способствовать восстановлению и регенерации поврежденных тканей в СМД.

Поскольку МГТБ представляют собой пептидно-белковые комплексы, выяснение состава и структуры которых представляет собой в случае каждого из объектов исследования отдельную задачу, данная работа представляет собой начальную стадию длительного многоэтапного исследования.

3.1 Выделение МП из гепатопанкреаса краба

Краткое описание объекта исследования

Гепатопанкреас у морских беспозвоночных – это большой пищеварительный орган с продольной симметрией, состоящий из множества слепых трубочек (рисунок 1).

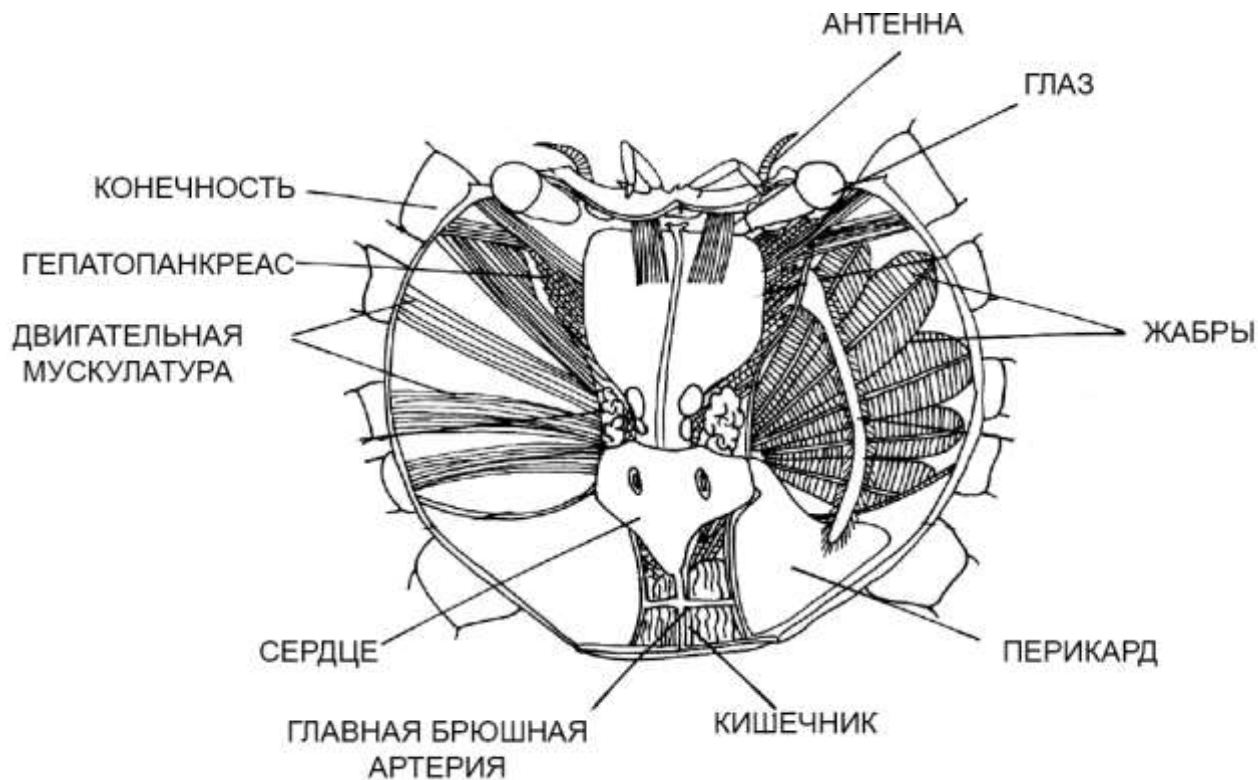


Рисунок 1. Органы краба в разрезе (по Felgehauer [96])

Его основные функции – переваривание пищи, транспорт питательных веществ, секреция пищеварительных ферментов и хранение липидов, гликогена, а также ряда минералов [97]. Трубки состоят из четырех основных типов клеток: E-, F-, R- и B-клеток.

E-клетки, или "эмбриональные" - это маленькие клетки, расположенные в "тупиках" трубочек и, предположительно, являющиеся предшественниками трех других типов клеток этого органа [97, 98]. Они характеризуются большим ядром с выраженным ядрышком, развитой шероховатой и гладкой эндоплазматической сетью и аппаратом Гольджи, и, как правило, не имеет выраженных ворсинок на мембране.

F-клетки, или "фибрилярные" - это базально расположенные клетки с хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью, которая при электронномикроскопическом исследовании придает клеткам фибриллярную структуру. Митохондрии и аппарат Гольджи также обнаруживаются в большом количестве, как маленькие пузырьки, разбросанные по всей цитоплазме. На мембране присутствуют ворсинки. Клетки обладают широким разнообразием функций, таких как синтез белка и хранение питательных веществ [99].

B-клетки, или "блистерные" - это крупные клетки, имеющие в первую очередь секреторную функцию. Для них характерно наличие больших везикул в окружении плотной цитоплазмы с высоким содержанием шероховатой эндоплазматической сети [96, 100]. Ворсинчатые структуры на поверхности этих клеток также присутствуют, хотя менее выражены [101]. Эти клетки являются основными производителями пищеварительных ферментов в ткани гепатопанкреаса.

R-клетки ("резервные") являются наиболее многочисленным типом клеток. Эти высокие, столбчатые клетки характеризуются развитыми структурами ворсинок на поверхности, центральным расположением ядра, и большого количества везикул для хранения и запасаения веществ (в первую очередь липидов) в их цитоплазме. Эти клетки участвуют во всасывании и усвоении питательных веществ. Кроме того, они создают запасы минеральных веществ, таких как кальций, магний, фосфор, сера, и другие. Например, гепатопанкреас креветки *Procarisascensionis* содержит очень большие (до 80 мкм) минеральные включения в R-клетках [102].

Таким образом, данный орган является сложной структурой, не имеющей прямого аналога у позвоночных животных. Он является сильно разветвленной полостью с большой поверхностью контакта содержимого пищеварительного тракта с выстилающими тканями, которые производят секрецию пищеварительных ферментов и всасывание и запасаение питательных веществ. Небольшие количества

гепатопанкреаса краба используют для получения некоторых ферментов, но в основном он является отходом пищевой промышленности.

Выделение мембранотропных пептидов

Получение экстракта проводили путем помещения измельченной на небольшие фрагменты ткани гепатопанкреаса краба в физиологический раствор для ракообразных (раздел 2.1). Проверка тканевого экстракта на наличие мембранотропной активности показала ее присутствие (рисунок 2).

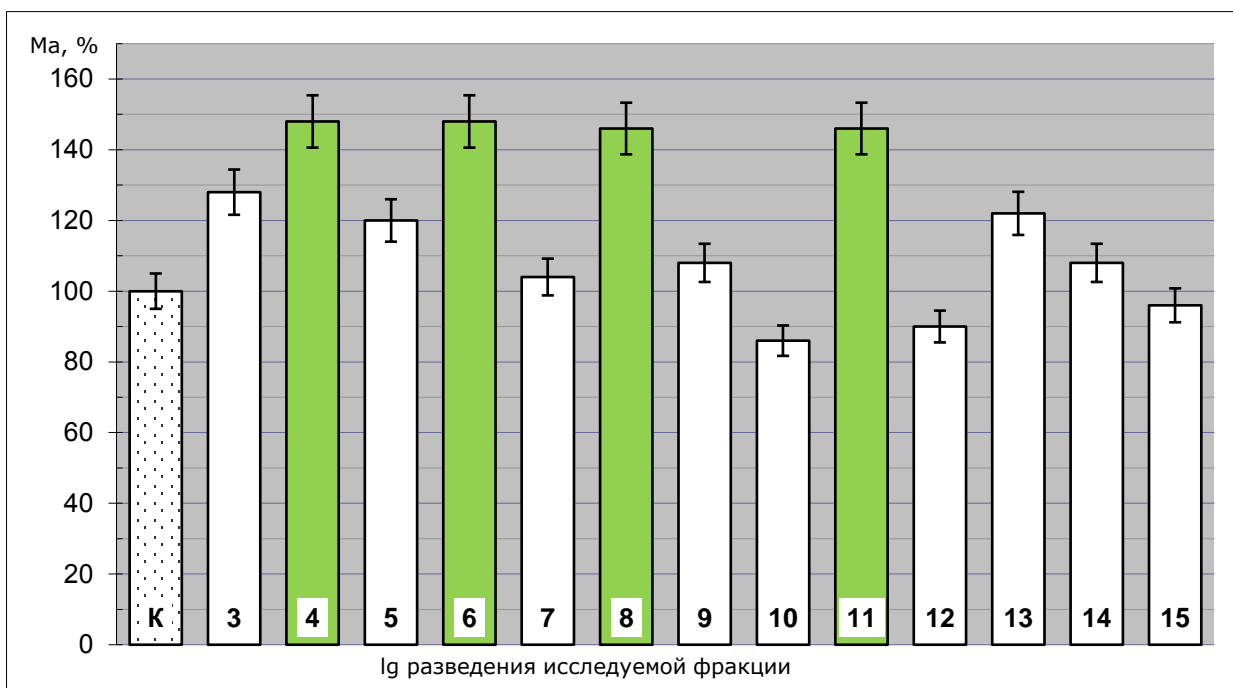


Рисунок 2. Мембранотропная активность тканевого экстракта гепатопанкреаса краба.

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

Далее в условиях создания насыщенного раствора сульфата аммония в тканевом экстракте получали надосадочную жидкость и осадок, которые собирали и после длительного диализа данные фракции исследовали на проявление мембранотропной активности.

В полученном после высаливания экстракта супернатанте также была обнаружена специфическая для МГТБ мембранотропная активность (рисунок 3).

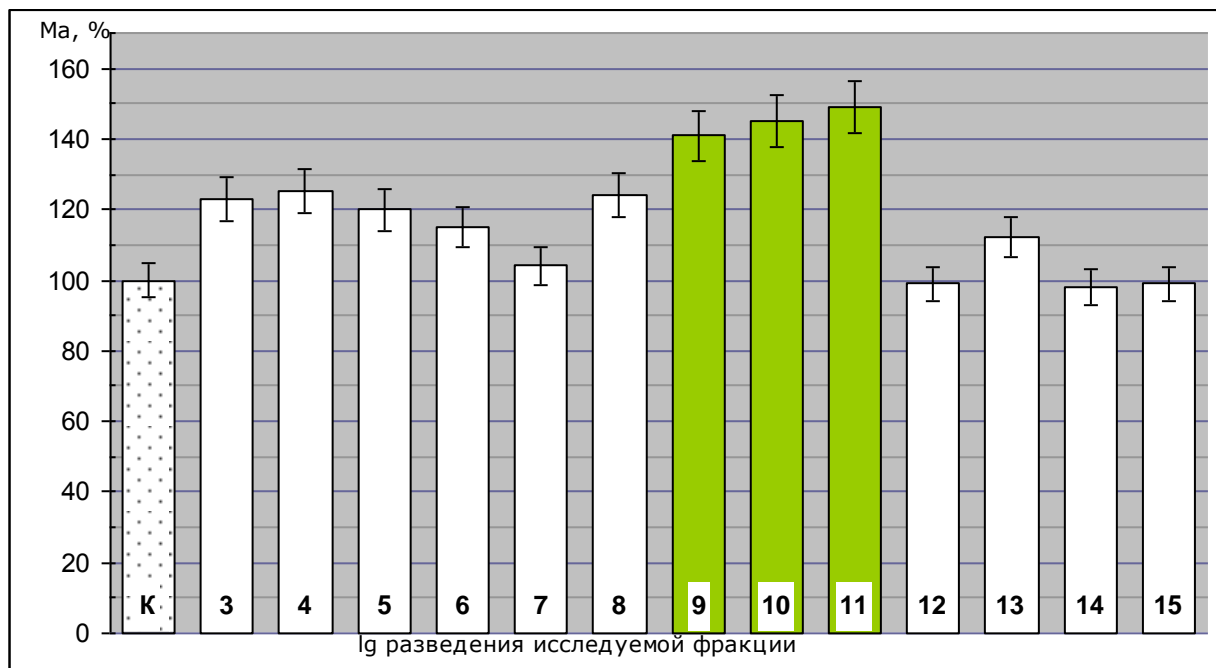


Рисунок 3. Мембранотропная активность супернатанта, полученного при высаливании тканевого экстракта гепатопанкреаса краба.

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

Осадок, полученный после осаждения примесных белков сульфатом аммония, не проявлял мембранотропной активности и его далее не изучали (рисунок 4). Согласно полученному распределению мембранотропной активности по фракциям, далее исследовали фракцию супернатанта [103]. Такая картина распределения данного типа биологической активности между двумя основными фракциями, получаемыми в начале процесса выделения, является обычной для МГТБ [1].

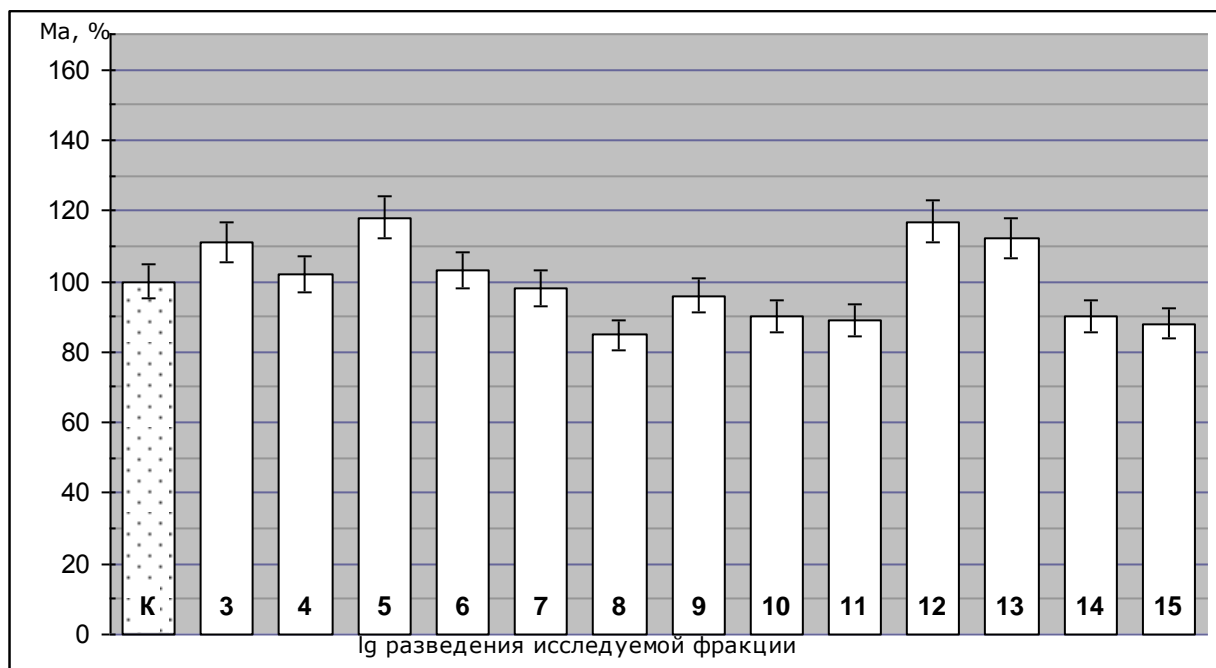


Рисунок 4. Мембранотропная активность осадка, полученного при высаливании тканевого экстракта гепатопанкреаса краба.

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.

Физико-химические свойства супернатанта, выделенного из тканевого экстракта

Супернатант в дальнейшем исследовали физико-химическими методами. Методом лазерной корреляционной спектроскопии было показано образование в супернатанте крупных (около 250 нм) наноразмерных частиц (рисунок 5). Для МГТБ характерна связь между их наноразмерным состоянием в растворах и проявлением ими биологической активности [2]. Для выделенных из супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба пептидов показана их агрегация в крупные наноразмерные частицы, что совпадает с картиной для пептидсодержащих фракций МГТБ, ранее исследованных на других объектах.

Далее была предпринята попытка разделения супернатанта методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, в результате были получены фракции со временем удерживания от 3,1 мин до 29,8 мин (рисунок 6). ВЭЖХ-фракции с временем

удерживания 3,1; 5,9; 21,5; 22,4 мин были исследованы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные значения молекулярных масс приведены в таблице 1.

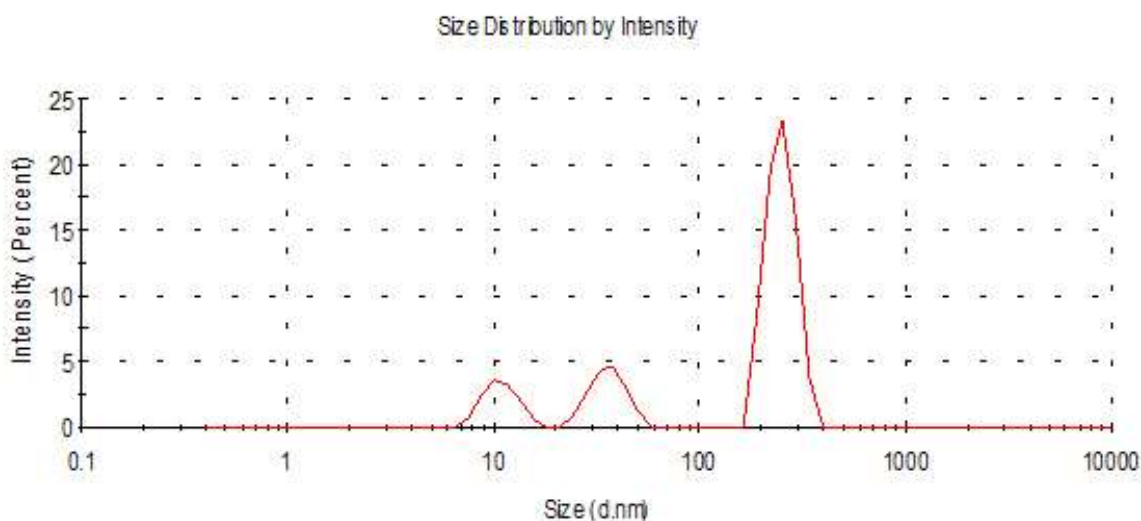


Рисунок 5 Данные наноразмерного состояния частиц в растворе супернатанта, выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса, полученные методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Эти данные указывают на присутствие в супернатанте тканевого экстракта, выделенного из гепатопанкреаса краба, широкого набора небольших пептидов. Однако следует отметить, что обнаруженная множественность пептидов может быть связана с их взаимодействием с различными ионами и молекулами воды, вследствие чего возможно образование дополнительного ряда молекулярных ионов, различающихся по значениям кажущихся молекулярных масс. Это затрудняет однозначную идентификацию отдельных пептидов в исследуемых нами фракциях на данном этапе очистки и свидетельствует только об их наличии в исследуемых фракциях. Решение этого вопроса возможно как результат проведения последующей рехроматографии с получением индивидуального пептида [76; 104], однако такой подход сопряжен с большими потерями вещества в связи со способностью изучаемых пептидов к образованию крупных наноразмерных частиц и из-за их взаимодействия с сорбентом вследствие их высокой тенденции к межмолекулярной ассоциации.

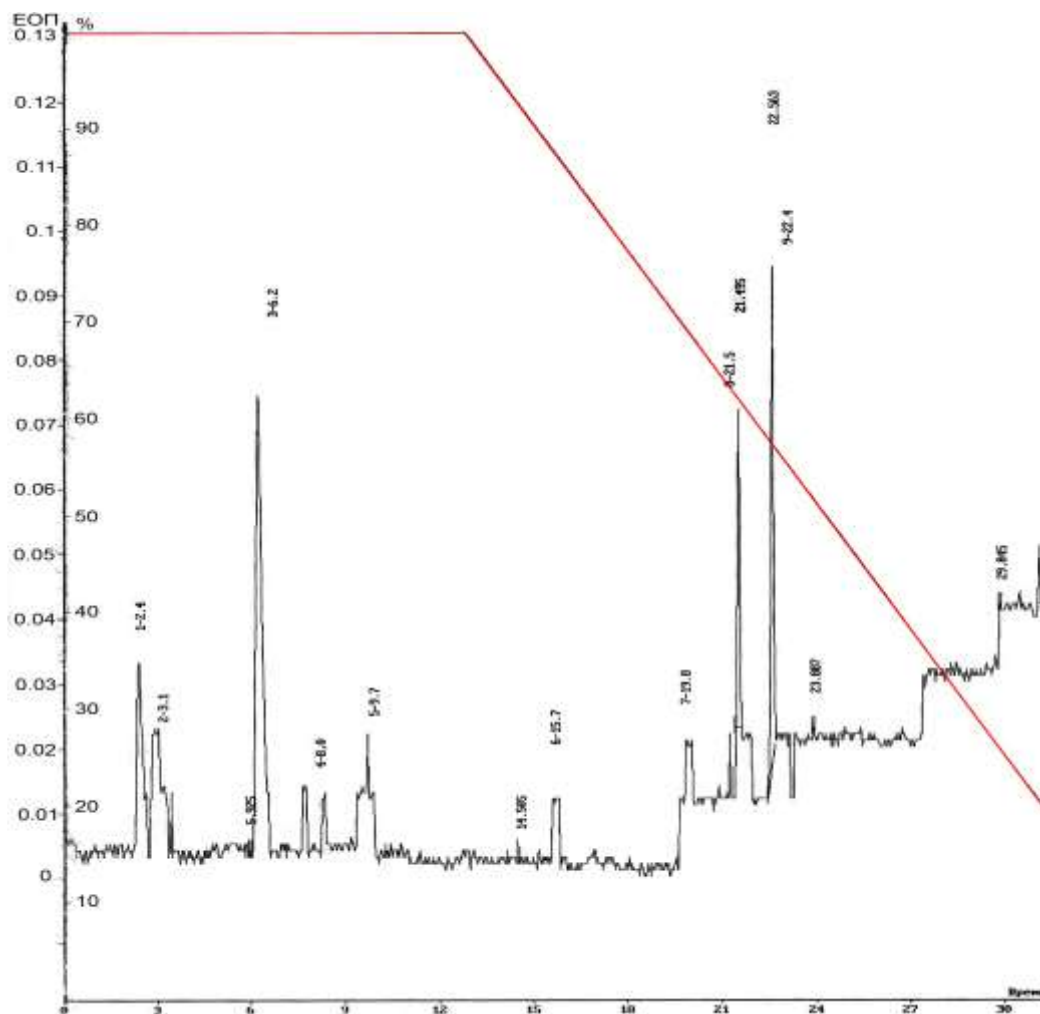


Рисунок 6. Разделение супернатанта, выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, методом ВЭЖХ.

Условия хроматографии здесь и далее: градиент концентрации вода – ацетонитрил от 5% до 80% со скоростью элюции 0,5 мл/мин и временем элюции 30 минут. По оси абсцисс – время элюции в мин; по оси ординат – 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 [103].

Ранее при исследовании вторичной структуры МГТБ было показано, что они присутствуют в водных растворах преимущественно в виде антипараллельных β -структур и статистического клубка [1, 2, 39].

Таблица 1. Характеристики фракций, выделенных из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба

№ п/п	Исследуемые фракции	Время удерживания (мин)	Молекулярные ионы, определенные методом MALDI-TOF	Наличие мембранотропной активности (метод 2)
1	ВЭЖХ	3,1	1052, 1096, 1152, 1166, 1252, 1335, 1435	135±7
2	ВЭЖХ	5,9	1059, 1261, 1328, 1347, 1504, 1821	отсутствует
3	ВЭЖХ	21,5	1001, 1044, 1074, 1235, 1382, 1444, 1617, 1791, 1955, 1981, 2000, 2174	отсутствует
4	ВЭЖХ	22,4	1059, 1160, 1346, 1509, 2077, 2104	отсутствует
5	Супернатант	-	2824; 4144; 4862; 4977; 5035; 5645; 5840; 6167; 7400; 8646; 8856	149±9

Однако при исследовании пептидов, содержащихся в супернатанте гепатопанкреаса краба, было обнаружено преимущественное содержание α -спиралей наряду со статистическим клубком. Можно предположить, что это связано с наличием в растворе некоторого количества других белков, не осажденных сульфатом аммония или со своеобразием свойств пептидов, выделенных из тканей ракообразных.

Таким образом, с применением экспериментального подхода, примененного ранее для исследования МГТБ тканей позвоночных животных и растений [1], в экстракте гепатопанкреаса камчатского краба были обнаружены вещества пептидной природы, проявляющие свойственную МГТБ мембранотропную активность и обладающие сходными с МГТБ физико-химическими свойствами.

Далее для изучения супернатанта был применен метод электрофореза в ПААГ. Было показано наличие фракции белка с молекулярной массой около 40 кДа (рисунок 7). В данных условиях не была обнаружена низкомолекулярная фракция, соответствующая пептидам, присутствовавшая в супернатантах при изучении МГТБ позвоночных [1]. Для идентификации полученной высокомолекулярной фракции она была вырезана из геля и подвергнута исследованию методом триптического гидролиза (раздел 2.6). Был проведен биоинформатический анализ для выявления гомологии с известными белками. По данным базы Mascot, наибольшая гомология была установлена с щелочной фосфатазой *Pseudomonas sp. Ag1* и *Pseudomonas fluorescens*. Для обсуждения этих данных необходимо сделать соответствующие пояснения.

Щелочные фосфатазы (ЩФ) – это семейство ферментов из класса гидролаз, осуществляющие дефосфорилирование белков, нуклеотидов, алкалоидов. В рамках настоящего исследования важно подчеркнуть факт, что строение активного центра ЩФ у бактерий и крабов идентично (по данным рентгеноструктурного анализа с разрешением порядка 2 ангстрема) [105, 106]. Этим, скорее всего, объясняется предложенная в базе данных гомология с ЩФ бактерий высокомолекулярного компонента, содержащегося в изучаемом супернатанте. По-видимому, данная фракция содержит ЩФ краба, поскольку маловероятно, что бактериальные ЩФ, выделенные из *Pseudomonas sp. Ag1* и *Pseudomonas fluorescens*, могли оказаться в тканевом экстракте гепатопанкреаса краба [107].

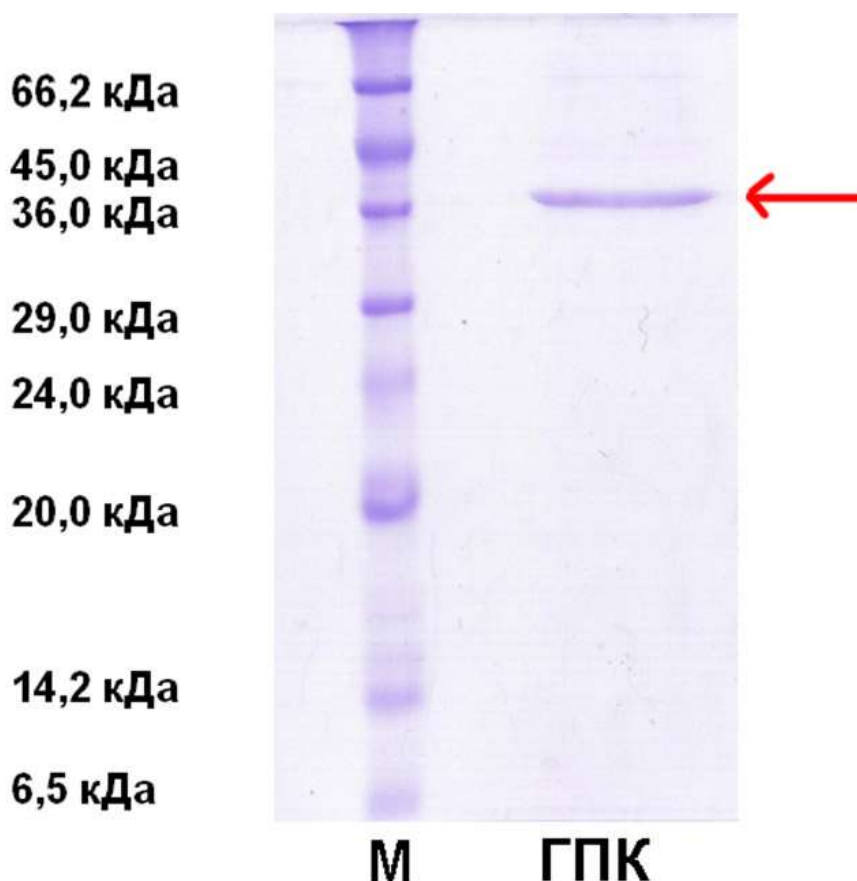


Рис 7. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракции супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (дорожка ГПК; обнаруженная высокомолекулярная фракция отмечена красной стрелкой). Маркерные белки (дорожка М): аprotинин из легкого быка - 6,5 кДа ; α -лактальбумин – 14,2 кДа; соевый ингибитор 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.

Как было показано ранее, основу структуры МГТБ составляют наноразмерные пептидно-белковые комплексы, проявляющие характерную мембранотропную активность [1, 2, 108]. Данные, полученные при электрофорезе супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба, также позволяют предположить, что высокомолекулярная фракция соответствует пептидно-белковому комплексу МГТБ, выделенному из этого органа, и что щелочная фосфатаза может играть роль белка-модулятора в структуре МГТБ, присутствующего в ткани гепатопанкреаса краба. В пользу данного предположения свидетельствуют также результаты исследования

мембранотропной активности препарата, полученного при смешивании пептидных ВЭЖХ-фракций, с фракцией осадка, полученного после высаливания тканевого экстракта гепатопанкреаса. Результаты данного эксперимента показали, что данная смесь не проявляла мембранотропной активности (таблица 2). Поскольку тканевой экстракт, выделенный из гепатопанкреаса краба, также не проявлял мембранотропной активности, можно предположить, что после взаимодействия пептидсодержащих фракций и осадка образуется неактивный комплекс, и в осадке содержится вещество, модулирующее активность мембранотропных пептидов (МП).

Таблица 2. Исследование мембранотропной активности объединенной пептидной фракции и осадка, выделенных из тканевого экстракта гепатопанкреаса, а также препарата, образованного при их взаимодействии.

Исследуемая фракция	Концентрация белка, мг/мл	Проявление мембранотропной активности (Ma)
Смесь ВЭЖХ-фракций	0,01	141%±5
Осадок, полученный при высаливании тканевого экстракта	0,1 мг/мл	отсутствует
Смесь ВЭЖХ – фракций + осадок	0,11 мг/мл	отсутствует

Суммируя данные, полученные при исследовании веществ, выделенных из экстракта гепатопанкреаса краба, можно заключить, что в нем содержатся пептиды – МП, которые проявляют мембранотропную активность, характерную для МГТБ, а также физико-химические свойства, сходные со свойствами биорегуляторов данной группы. Исключение составили результаты, отражающие вторичную структуру пептидно-белкового комплекса. Однако следует отметить, что подобная картина состояния вторичной структуры пептидов и белков, входящих состав МГТБ, обнаруживалась для некоторых растений [109].

Обнаружение ЩФ во фракции супернатанта, выделенного из ткани гепатопанкреаса краба, также указывает на возможное сходство в строении

биорегуляторов данной группы. В отсутствие альбуминов в составе тканей краба, возможно, данный фермент выполняет функцию белка-модулятора.

3.2 Выделение МП из двустворчатого моллюска жемчужницы *Margaritifera margaritifera*

Краткое описание объекта исследования

Также объектом поиска и изучения МП была выбрана пресноводная жемчужница (*Margaritifera margaritifera*). В качестве объекта сравнения были выбраны голубые мидии.

Морфология беспозвоночных не предполагает четкого деления организма на специализированные сепаратные органы, как у позвоночных животных. Органы и системы устроены значительно примитивнее, и не имеют прямых аналогов с органами млекопитающих, которые были ранее широко исследованы на предмет свойств МГТБ, входящих в их состав. Ввиду этого представлялось нецелесообразным проводить препарирование большого количества особей, необходимых для наработки достаточного для выделения МП количества сырья, на отдельные органы, поскольку задача об изучении тканевой специфичности, проявляемой МГТБ на использованных ранее в таких случаях моделях здесь представляется изначально довольно спорной.

В качестве обоснования выбора объекта можно изложить следующие соображения. В первую очередь, были выбраны моллюски, принципиально различающиеся по местообитанию и в то же время сходные по строению и образу жизни [110]. Многие морские беспозвоночные ведут прикрепленный образ жизни, который необходим для их питания и размножения. В том числе такой образ жизни ведут исследованные в данной работе двустворчатые моллюски – пресноводная жемчужница [111] и голубые мидии [112]. Последние используют для фиксации на различных субстратах т. н. биссусные нити [113], что является еще одним примером адгезивных взаимодействий в живых организмах, но на органном, а не клеточном уровне.

Пресноводная жемчужница вызвала интерес в связи с некоторыми особенностями ее жизненного цикла – т. н. "пренебрежимым старением", являющимся предметом ожесточенной дискуссии ряда исследователей [114–116], а также паразитическим способом развития личинок на жабрах лососевых рыб [117, 118].

Особенный интерес представляет именно последний аспект. Необходимым условием для существования и развития популяции жемчужницы служит наличие в реке лососевых рыб, в жабрах которых протекает развитие личиночной стадии моллюска — глохидиев. В то же время зрелые особи жемчужницы делают более благоприятной среду для популяции лосося в реке, в том числе активно очищают воду при питании от взвесей, способствуют увеличению разнообразия сопутствующих бентосных животных, служат субстратом для обрастаний, а также, предположительно, разрыхляют дно и облегчают постройку нерестовых бугров семги [118]. Наряду с этим, личинки моллюска паразитируют на лососе в течение сравнительно короткого времени и не причиняют вреда хозяину на уровне межпопуляционных взаимодействий, когда для моллюсков и рыб их взаимная польза является одновременной. В последующем на основе развития основных постулатов данной гипотезы были сформулированы представления о положительном влиянии глохидиозов на молодь лосося [118], что принципиально является изученным вопросом - известны симбиотические связи между горчачками (карповые рыбы подсемейства *Acheilognathinae*) и двустворчатыми моллюсками семейства *Unionidae* (намного реже - *Margaritiferidae*) [114]. При паразитировании личинки (глохидия) моллюска после закрепления на поверхности жабр рыбы-хозяина стимулируют образование вокруг своего тела эпителиальной капсулы. Вероятно, глохидии пресноводной жемчужницы могут стимулировать восстановление покровного эпителия посредством биологически активных веществ, входящих в состав вырабатываемого ими секрета. Учитывая необычность свойств изучаемого объекта, для сравнения свойств МП, в том числе их специфической биологической активности, аналогичным образом проводили выделение МП из других двустворчатых моллюсков – голубых мидий. Мидии

являются доступным сырьем и при этом достаточно хорошо изучены. Они образуют колоссальные колонии на литорали, каменистых берегах и в местах, где присутствует течение либо достаточно сильные приливы и отливы, которые приносят большое количество пищи для этих моллюсков и при этом не дают воде застаиваться.

Выделение мембранотропных пептидов

Для выделения МП использовали взрослых особей пресноводной жемчужницы, содержащих глохидиев; для выделения МП из мидий использовали ткани свежепойманных взрослых особей. Тканевые экстракты, а также фракции, полученные после высаливания сульфатом аммония тканей двустворчатых моллюсков, исследовали на проявление мембранотропной активности методом биотестирования (рисунки 8 - 13). Как при исследовании фракций, выделенных из жемчужницы, так и в случае исследования голубых мидий были получены сходные результаты. Как тканевые экстракты, так и полученные из них супернатанты проявляли мембранотропную активность, в том числе в СМД. Фракции осадков не проявляли данный вид активности.

Была проведена обращенно-фазовая ВЭЖХ фракции супернатанта, полученного из тканевого экстракта жемчужницы. Она показала наличие нескольких гидрофильных фракций, выходящих в начале градиента вода-ацетонитрил [77] (рисунок 14). Сходная картина разделения была получена и при проведении 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 (рисунок 15).

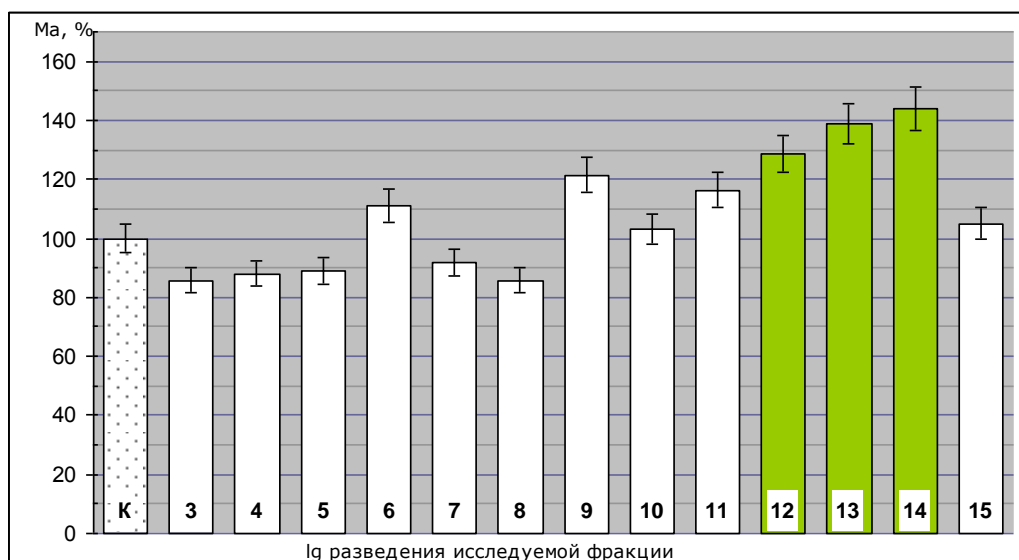


Рисунок 8. Мембранотропная активность тканевого экстракта жемчужницы.

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.

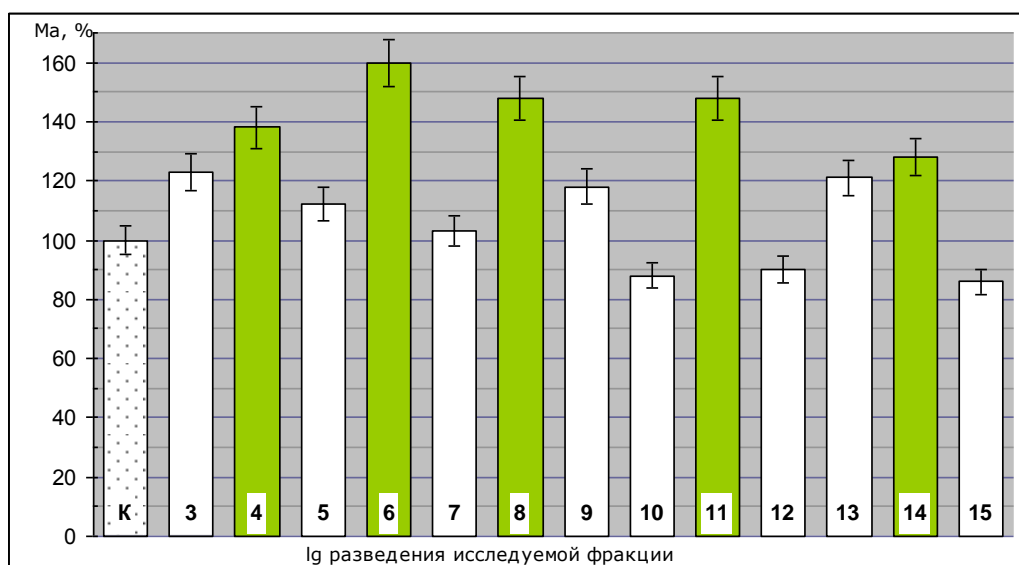


Рисунок 9. Мембранотропная активность супернатанта, полученного при высаливании тканевого экстракта жемчужницы.

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.

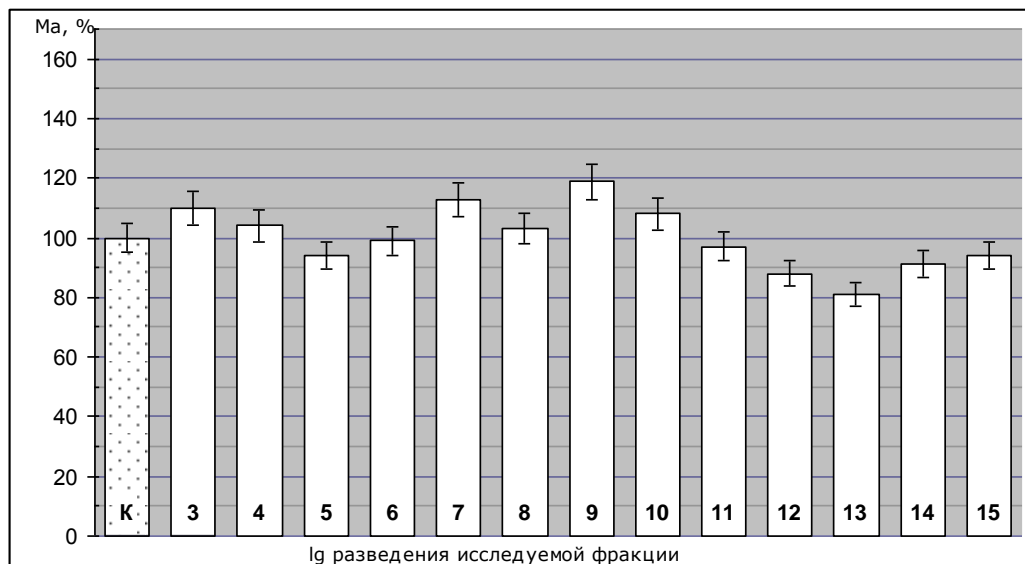


Рисунок 10. Мембранотропная активность осадка, полученного при высаливании тканевого экстракта жемчужницы.

По абсциссе – показатель степени последовательного 10-кратного разведения исходного препарата с концентрацией белка 0,1 мг/мл (K-контроль); по ординате - Ma, % - величина параметра, отражающего мембранотропную активность.

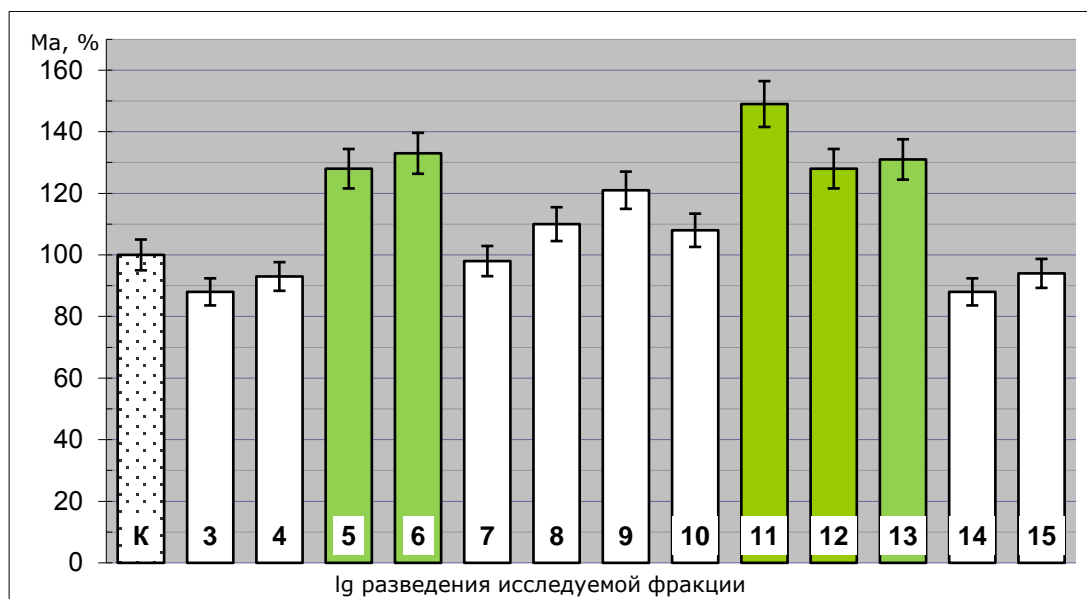


Рисунок 11. Мембранотропная активность тканевого экстракта мидий.

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

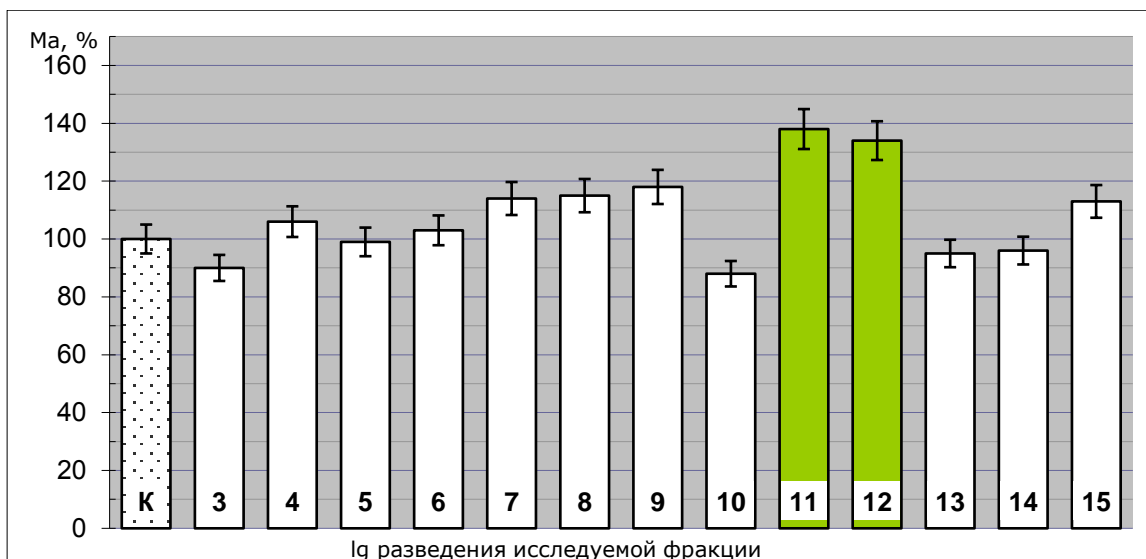


Рисунок 12. Мембранотропная активность супернатанта, полученного при высаливании тканевого экстракта мидий.

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

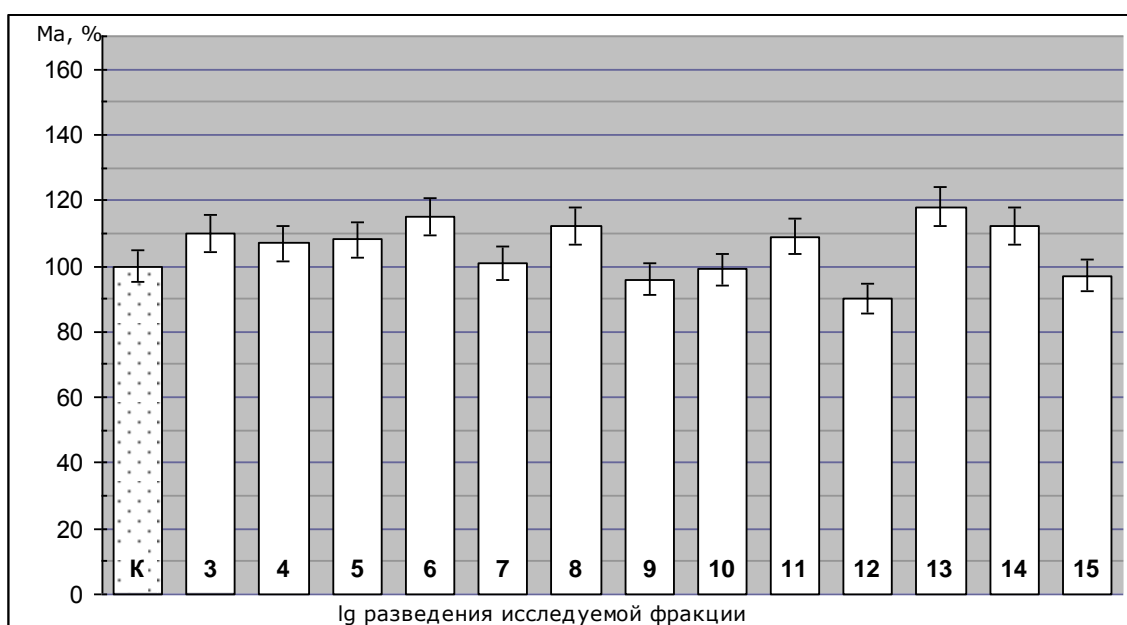


Рисунок 13. Мембранотропная активность осадка, полученного при высаливании тканевого экстракта мидий.

По абсциссе – показатель степени последовательного 10-кратного разведения исходного препарата с концентрацией белка 0,1 мг/мл (K-контроль); по ординате - Ma, % - величина параметра, отражающего мембранотропную активность.

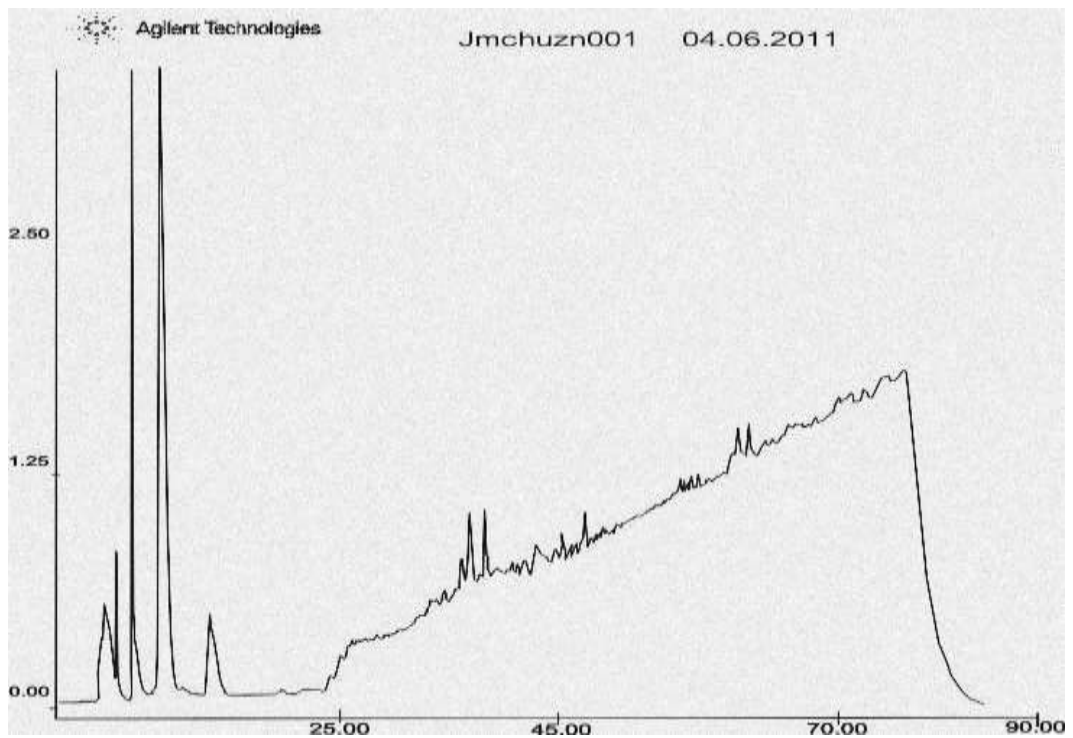


Рисунок 14. ВЭЖХ-хроматограмма разделения супернатанта тканевого экстракта моллюска жемчужницы.

По оси абсцисс – время элюции (мин), по оси ординат – единицы оптической плотности.

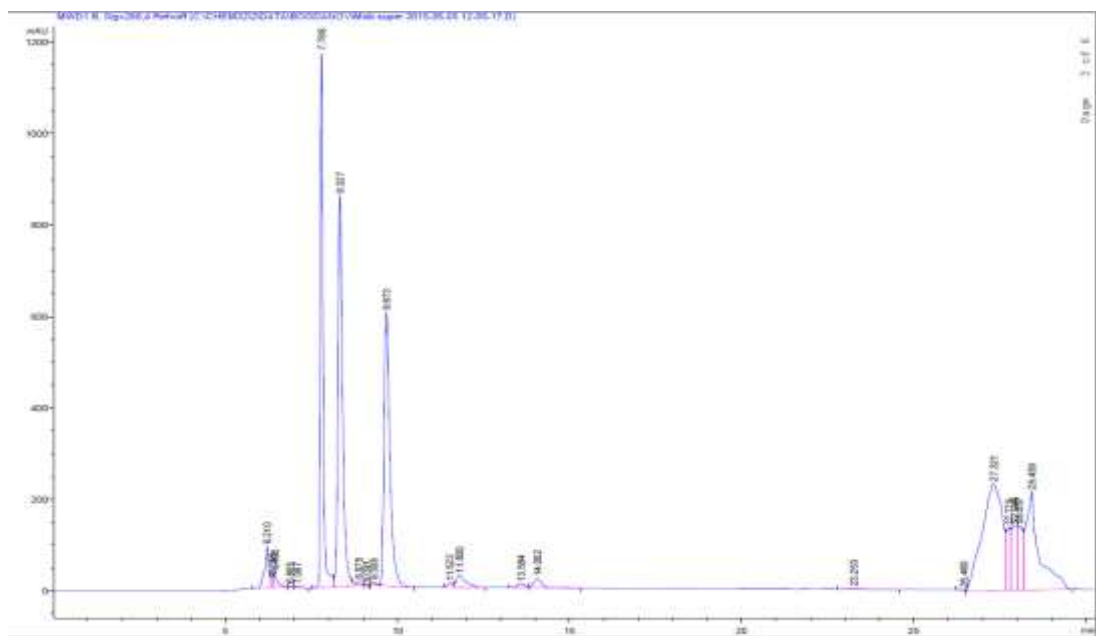


Рисунок 15. ВЭЖХ-хроматограмма разделения супернатанта тканевого экстракта голубых мидий.

По оси абсцисс – время элюции (мин), по оси ординат – единицы оптической плотности.

Таблица 3. Исследование мембранотропной активности ВЭЖХ-фракций, выделенных из тканевых экстрактов двустворчатых моллюсков

Исследуемые фракции	Время удерживания (мин)	Наличие мембранотропной активности
Жемчужница, ВЭЖХ 1	3,1	отсутствует
Жемчужница, ВЭЖХ 2	6,3	отсутствует
Жемчужница, ВЭЖХ 3	11,5	отсутствует
Жемчужница, ВЭЖХ 4	14,4	149±5%
Мидии, ВЭЖХ 1	7,8	отсутствует
Мидии, ВЭЖХ 1	8,3	131±5%
Мидии, ВЭЖХ 1	9,6	отсутствует

Методом электрофореза в ПААГ было показано наличие в экстракте полученном из пресноводной жемчужницы, большого количества веществ белковой природы. При этом обращает внимание наличие высокого содержания низкомолекулярной (около 10 000 Да) компоненты. В супернатанте было показано присутствие только высокомолекулярной фракции с приблизительной массой в 66 000 Да. При этом на картине разделения методом электрофореза пептидная фракция не обнаруживалась (рисунок 16). Однако при исследовании супернатанта методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, было установлено, что в нем содержатся пептиды со следующими значениями «кажущихся» молекулярных масс: 778; 833; 985; 1040; 1248; 1404; 1455; 1795; 2224; 2338; 2601; 4176 Да. Отсутствие низкомолекулярной фракции пептидов при ПААГ-электрофорезе можно объяснить, как образованием в супернатанте комплекса пептидов и белка-модулятора, так и способностью пептидов формировать крупные наноразмерные ассоциаты. 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 50 000 дальтон (рисунок 17), и при этом методом MALDI-TOF масс-спектрометрии также были показаны небольшие пептиды с молекулярными массами 1356; 1440; 1455; 1500; 2346; 2390; 2430; 2472; 3080 Да.

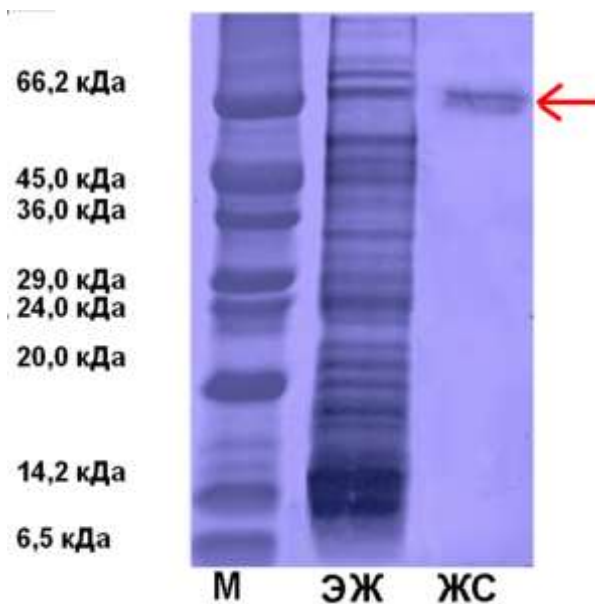


Рисунок 16. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из пресноводной жемчужницы.

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).

Для исследования физико-химических свойств растворов МП, выделенного из тканевого экстракта пресноводной жемчужницы, были применены методы кругового дихроизма и лазерной корреляционной спектроскопии. Спектр кругового дихроизма раствора супернатанта, выделенного из тканевого экстракта пресноводной жемчужницы, показал характерную для МГТБ картину вторичной структуры раствора пептидов.

Были получены следующие данные по составу вторичных белковых структур в этой фракции, в % содержания: α -спирали - 6,6; β -структуры параллельные - 5,5; β -структуры антипараллельные - 45,3; β -складки - 16,0; статистический клубок - 33,4. Для мидий были получены следующие данные: α -спирали – 4,9%; β -структуры: антипараллельные – 13,9%; параллельные – 2,2%; β -складки – 24,1%;

статистический клубок – 54,5%. Такая картина распределения вторичных белковых структур свойственна растворам МГТБ, выделенным из различных источников [1].

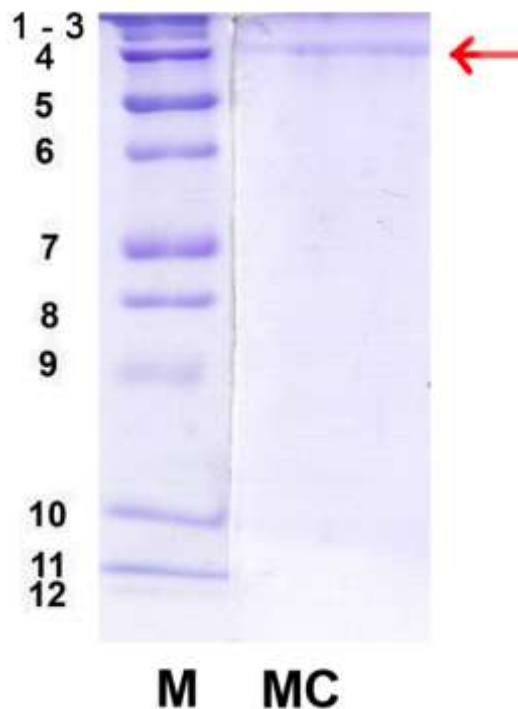


Рисунок 17. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из голубых мидий.

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.

Методом лазерной корреляционной спектроскопии было установлено, что в растворе супернатанта тканевого экстракта пресноводной жемчужницы образуются наноразмерные частицы со средним диаметром около 350 нм (рисунок 18). Это согласуется с ранее полученными данными по исследованию МГТБ тканей млекопитающих и указывает на формирование пептидами крупных межмолекулярных ассоциатов. Сходные данные были получены для раствора супернатанта, выделенного из тканевого экстракта голубых мидий, которые образовывали частицы со средним диаметром 150 нм (рисунок 19).

Суммируя данные, полученные при исследовании веществ, выделенных из тканевых экстрактов двустворчатых моллюсков, можно заключить, что в них

содержатся вещества пептидно-белковой природы, которые проявляют мембранотропную активность, характерную для МГТБ, и кроме того, они обладают физико-химическими свойствами, сходными со свойствами биорегуляторов этой группы.

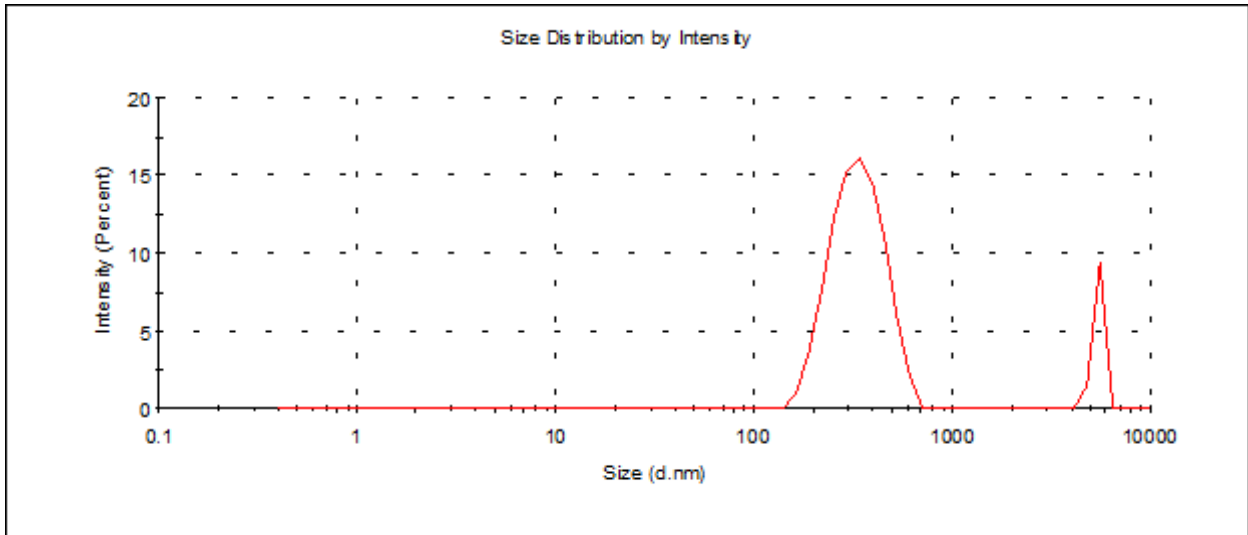


Рисунок 18. Данные наноразмерного состояния частиц в растворе супернатанта выделенного из тканевого экстракта глохидиев жемчужницы методом лазерной корреляционной спектроскопии.

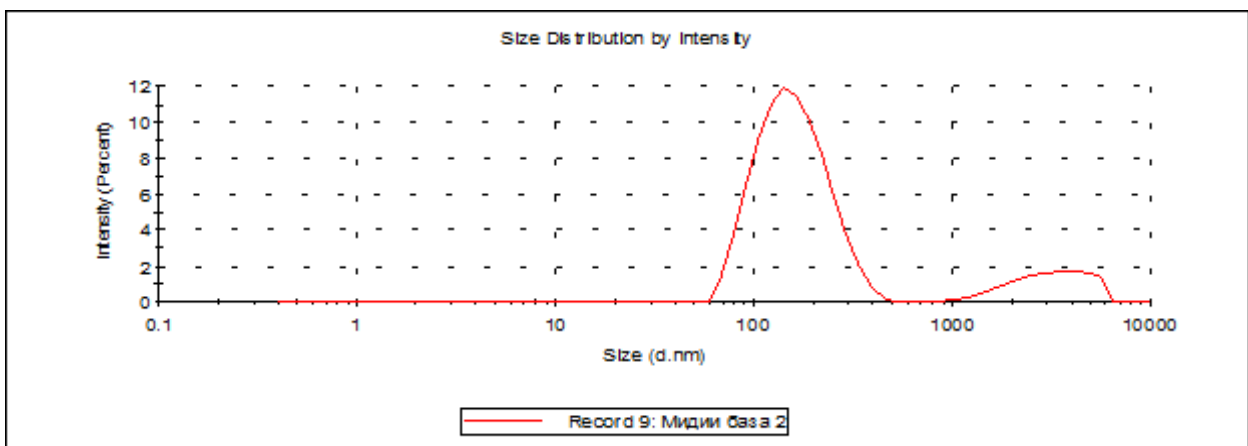


Рисунок 19. Определение наноразмерного состояния частиц в растворе супернатанта выделенного из тканевого экстракта мидий методом лазерной корреляционной спектроскопии.

3.3 Выделение МП из среды культивирования микроскопического гриба *Fusarium sambucinum*

Краткое описание объекта исследования

Еще одним объектом выделения МП в данной работе стал мицелий гриба *Fusarium sambucinum*, который относится к роду анаморфных плесневых грибов. Данный род широко распространен в природе, является фитопатогеном. Штаммы *F. sambucinum* наносят вред сельскому хозяйству, вызывая заболевания как у растений (фузариозы), так и у животных и людей (фузариотоксикозы). В то же время высказываются предположения о симбиотической природе некоторых видов [119]. Также на основе *F. sambucinum* успешно разработаны нетоксичные и непатогенные штаммы, чьи культуральные среды, могут выступать в качестве ценного сырья для косметической и лекарственной промышленности [120]. Такие свойства представителей рода *Fusarium* указывают на способность этих организмов вырабатывать большое количество различных биологически активных веществ.

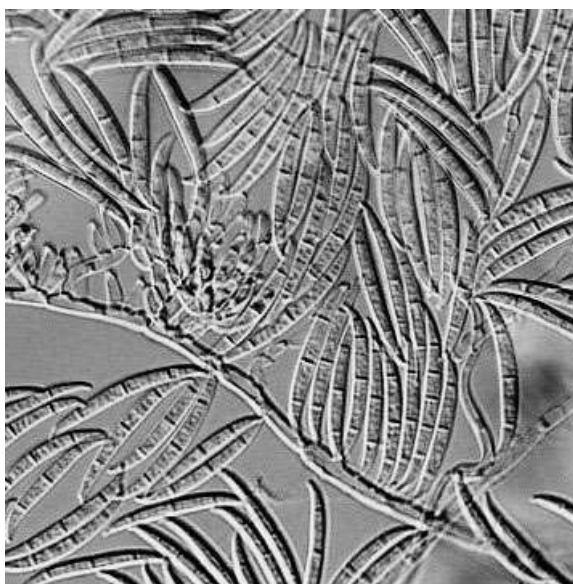


Рисунок 20. *Fusarium s.* (фазово-контрастный микроскоп, об. 40х ок. 10).

Грибы данного рода прежде всего известны как патогены, наносящие вред сельскохозяйственным культурам. Они вызывают специфические болезни (фузариозы) и токсические поражения (фузариотоксикозы) у различных растений

и питающихся ими животных, в том числе человека. Фузариозы у растений приводят к гнилостным поражениям и некрозу тканей корней, листьев, поражаются также плоды. Зараженные семена также утрачивают способность нормально развиваться. Некоторые виды фузариума ответственны за развитие кагатной гнили корнеплодов. Вторичным является поражение токсинами гриба консументов первого порядка – животных, употребивших зараженное растение в пищу. В сельском хозяйстве проблемой является поражение зерновых, поскольку случайное употребление в пищу продуктов (зерна, полученной из него муки) приводит к тяжелым последствиям (например, токсической алейки от токсинов из *Fusarium sporotrichioides*). Некоторые грибы рода *Fusarium* способны паразитировать на человеческой коже, вызывая дерматиты [119, 121].

Кроме паразитов, известны виды, ведущие сапротрофный образ жизни, для некоторых характерен мутуализм (взаимовыгодный симбиоз) с растениями. Симбионтные виды обитают в почве, в корневой зоне растений, их относят к микоризным грибам. Микориза представляет собой симбиоз мицелия гриба и корня высшего растения. Все голосеменные растения и некоторые цветковые используют микроскопические грибы для повышения эффективности процессов усвоения питательных веществ из почвы. Микориза работает как транспортная система для повышения площади всасывания корней и первичной переработки минеральных веществ. К грибам из корней высших растений поступают углеводы, аминокислоты и биологически активные вещества, такие как фитогормоны [121].

Таким образом, значение микоризы в жизнедеятельности как гриба, так и высшего растения чрезвычайно велико. Растение хорошо усваивает минеральные соли и воду, благодаря мицелию гриба. В свою очередь гриб получает из корня высшего растения готовые органические вещества, которые не в состоянии синтезировать самостоятельно из-за отсутствия хлорофилла. Крайне важные для растений элементы (фосфор, азот, калий, кальций) содержатся в почве в форме соединений, недоступных для поглощения растениями. Грибы в микоризе преобразуют эти соединения и поставляют в корневую систему растений. В засушливых регионах микориза выполняет функцию обеспечения влагой

древесных растений. Следует отметить, что грибы, участвующие в микоризе, защищают растения от патогенных организмов, в частности от поражения другими вредными грибами. Из таких видов имеют значение для сельского хозяйства *Fusarium heterosporum* и *Fusarium s.* Они живут на корнях пшеницы и положительно влияют на развитие растения.

Несмотря на вред, наносимый сельскому хозяйству, такой коэволюционный способ сосуществования двух видов живых организмов, как микориза, привлекает большой научный интерес. Он обусловлен сложной системой регуляции межвидовых взаимодействий, благодаря которым растение может питаться продуктами жизнедеятельности гриба.

Выделение МГТБ из культуральной среды гриба *Fusarium s.* и изучение их свойств осуществляли, используя экспериментальный подход, который был ранее разработан для исследования этих эндогенных биологически активных веществ [1, 21]. Вначале среда культивирования, из которой производилась экстракция, подвергалась высаливанию сульфатом аммония. Среда культивирования, а также полученные фракции надосадочной жидкости (супернатанта) и осадка, изучались на проявление ими мембранотропной активности. Было установлено, что после высаливания культуральной среды данный вид активности проявляли как фракция супернатанта, так и фракция осадка (рисунки 21-23). Далее изучали супернатант, поскольку именно эта фракция изучалась ранее при исследовании МГТБ, выделенных из различных тканей животных и растений [1]. Кроме того, фракция осадка содержала большое количество трудноотделяемых примесей органических веществ, что являлось значительным препятствием для ее фракционирования. Супернатант разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрил-вода. Была получена следующая картина разделения (рисунок 24).

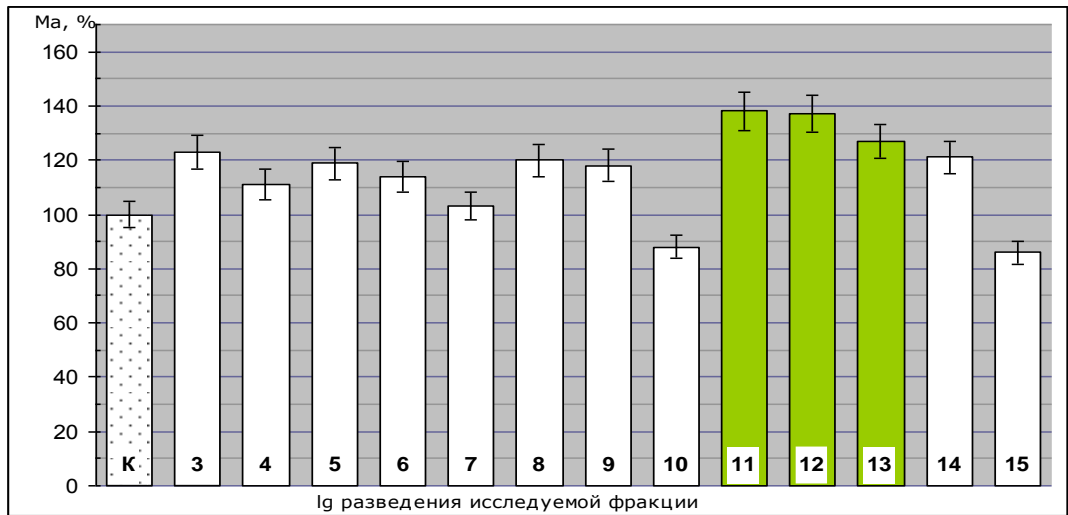


Рисунок 21. Мембранотропная активность среды культивирования *Fusarium s.*

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.

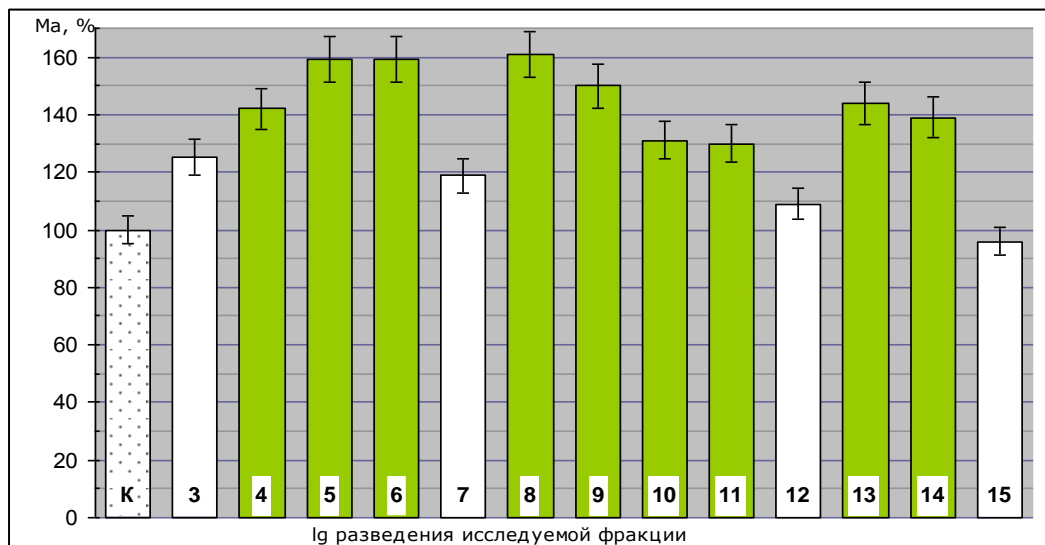


Рисунок 22. Мембранотропная активность супернатанта, полученного при высаливании среды культивирования *Fusarium s.*

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.

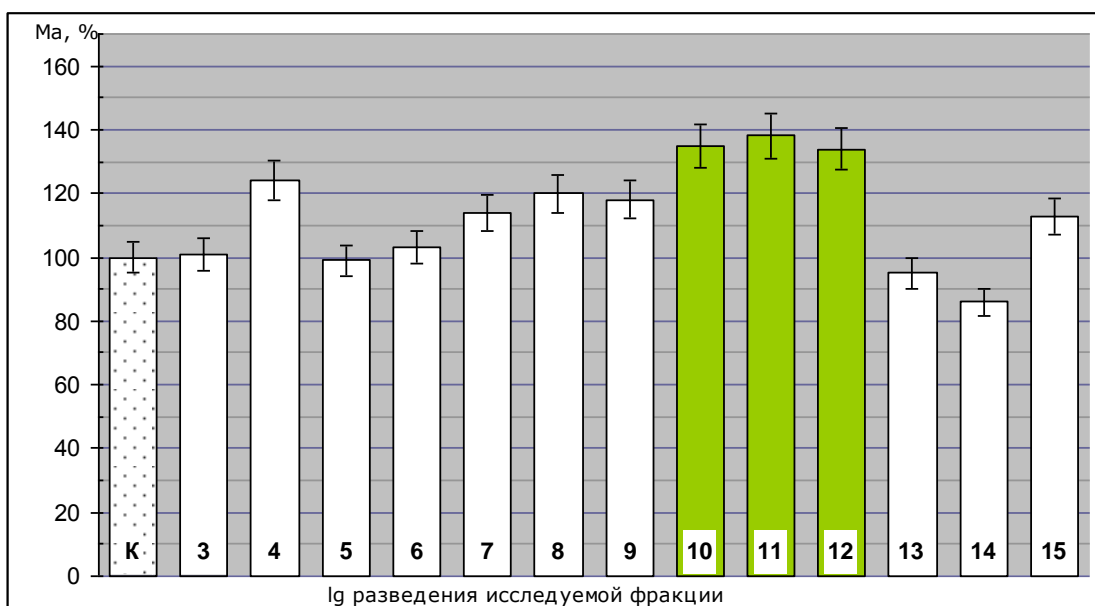


Рисунок 23. Мембранотропная активность осадка, полученного при высаливании среды культивирования *Fusarium s.*

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.

Методом биотестирования было показано, что мембранотропную активность проявляли ВЭЖХ-фракции, характеризующиеся временем удерживания 6,25 – 14,52 мин [122]. Эти данные полностью коррелируют с результатами исследования ВЭЖХ супернатантов экстрактов различных тканей и животных, содержащих МГТБ: они элюируются также в начале градиента ацетонитрил-вода. 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). Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было показано, что данные фракции содержат ряд пептидов с молекулярной массой 1000 – 2100 Да. Поскольку методом MALDI-TOF масс-спектрометрии определяется значение молекулярного иона (m/Z), можно предположить, что обнаруженные в супернатанте и отдельных ВЭЖХ-фракциях сигналы, относятся к одним и тем же пептидам, отличающимся друг от друга по заряду и присоединению ионов таких низкомолекулярных веществ как вода и

сульфат аммония. Итоговые данные, характеризующие ВЭЖХ-фракции супернатанта, выделенного из культуральной среды гриба, приведены в таблице 4.

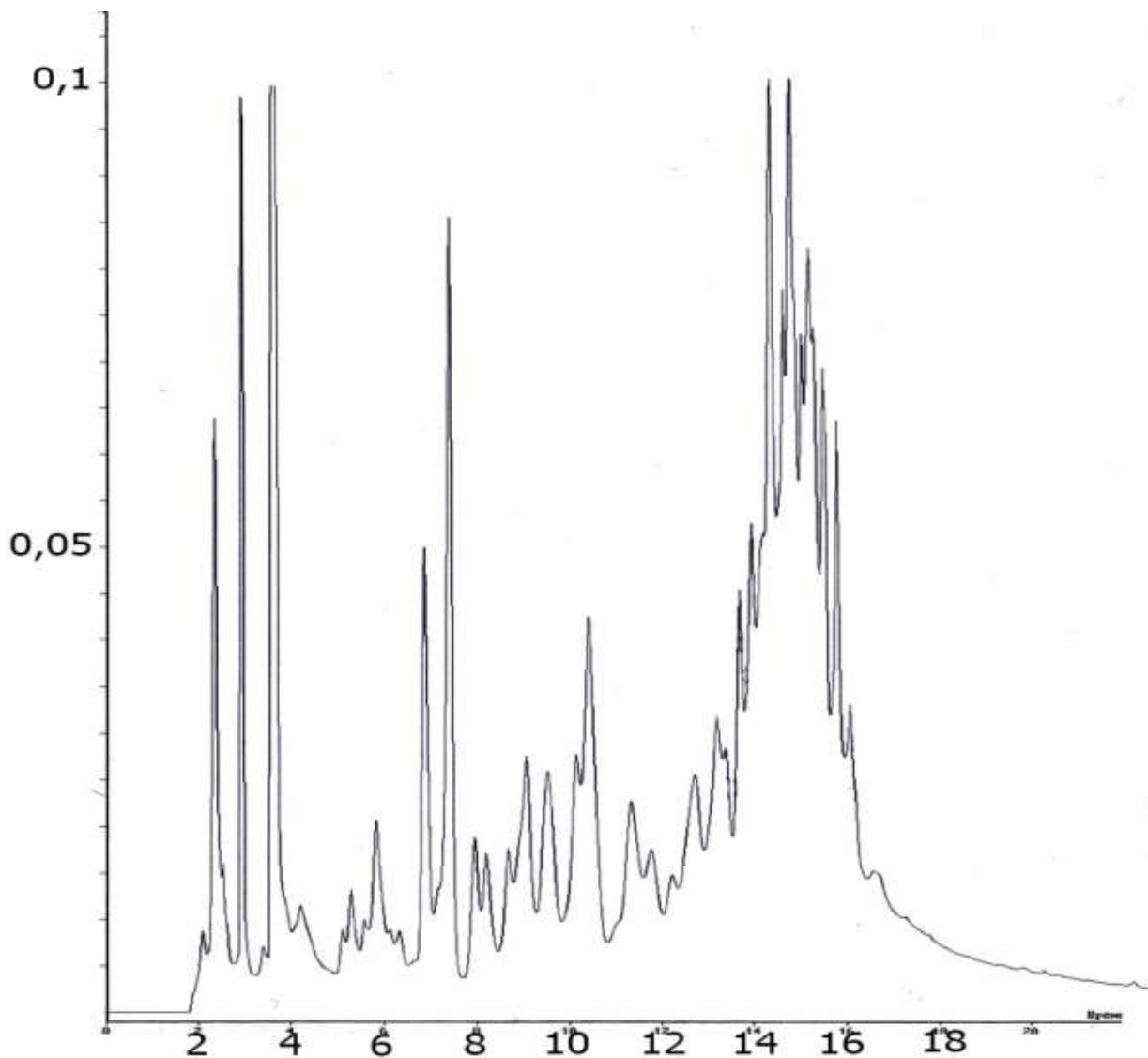


Рисунок 24. Разделение супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.*, методом ВЭЖХ.

По оси абсцисс – время элюции (мин), по оси ординат – единицы оптической плотности.

Полученные результаты показывают, что наибольшую активность проявляла именно суммарная фракция пептидов [122]. Возможно, это связано с их адгезионной активностью и образованием этими пептидами наноразмерных частиц. Как было показано ранее, наноразмерное состояние пептидно-белковой компоненты биорегуляторов связано с ее способностью проявлять биологическую

активность в СМД, а по мере очистки пептиды, входящие в состав МГТБ, наоборот, утрачивали свою биологическую активность [2].

Таблица 4. Характеристики фракции супернатанта и ВЭЖХ-фракций, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium s**.

Название исследуемой фракции	Время удерживания, мин	Мембранотропная активность, (метод 2), %	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 лазерной корреляционной спектроскопии было показано присутствие во фракции супернатанта наноразмерных частиц со средним размером около 180 нм (рисунок 25). Данные литературы свидетельствуют о том, что тенденцию к межмолекулярной ассоциации проявляют пептиды со вторичной структурой, характеризующейся преимущественным содержанием неупорядоченных участков и β-структур [123]. Именно такая вторичная структура была обнаружена при исследовании пептидов, входящих в состав супернатанта и выделенных из него ВЭЖХ-фракций (таблица 5).

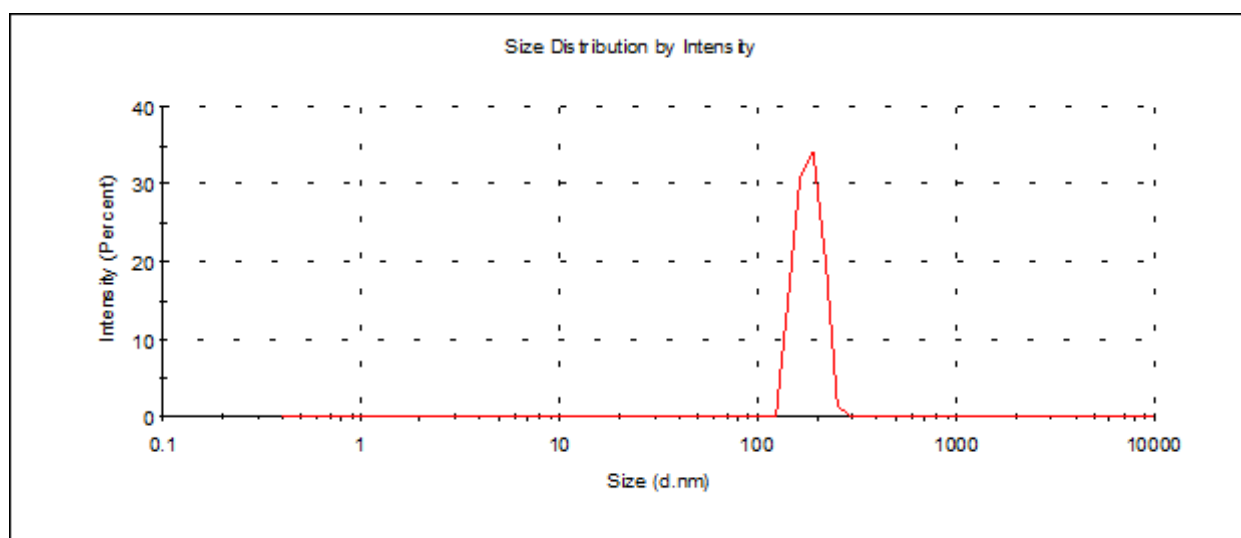


Рисунок 25. Определение наноразмерного состояния частиц в растворе супернатанта, выделенного из культуральной среды гриба *Fusarium s.* методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Таблица 5. Вторичная структура мембранотропных пептидов, содержащихся в супернатанте и ВЭЖХ-фракциях, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium s.*

Элементы вторичной структуры	Исследуемая фракция			
	Супернатант	1	2	3
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

Методом электрофореза в ПААГ было показано наличие во фракции супернатанта, полученного из культуральной среды *Fusarium s.*, высокомолекулярной фракции с приблизительной массой в 66 000 Да (рисунок 26).

При этом на картине разделения методом электрофореза пептидная фракция не обнаруживалась. Отсутствие низкомолекулярной фракции пептидов при ПААГ-электрофорезе можно объяснить, как способностью пептидов формировать крупные наноразмерные ассоциаты, так и образованием в супернатанте комплекса пептидов и белка-модулятора.

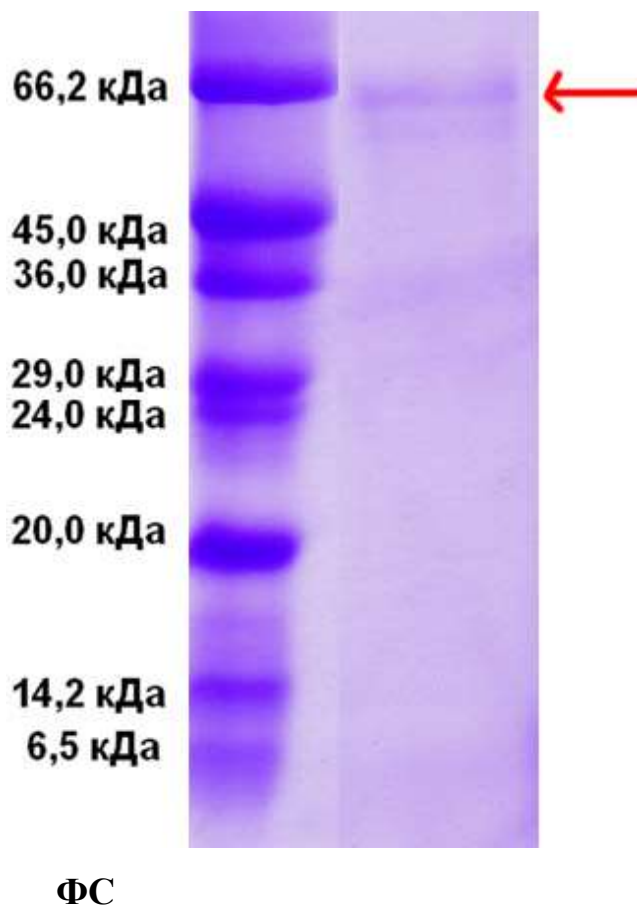


Рисунок 26. Электрофоретическое разделение в ПААГ фракций, полученных из мицелия *Fusarium s.*

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).

Таким образом, было показано, что в культуральной среде гриба *Fusarium s.* присутствуют вещества пептидной природы, по проявлению мембранотропной активности характеризующейся полимодальностью дозовой зависимости и

действием в СМД, а также по проявлению ряда физико-химических свойств, сходных со свойствами МГТБ.

Обнаруженные при электрофоретическом разделении супернатантов, выделенных из тканевых экстрактов двустворчатых моллюсков и культуральной среды мицелия *Fusarium s.*, высокомолекулярные компоненты имеют молекулярную массу около 65 кДа (рисунки 16, 17, 26). Для идентификации этих высокомолекулярных белковых фракций они были вырезаны из геля и подвергнуты исследованию методом триптического гидролиза для выявления гомологии с известными белками. По данным базы Mascot, для фракций, выделенных из тканей двустворчатых моллюсков, а также из культуральной среды *Fusarium s.* наибольшая гомология была установлена с белками семейства альбуминов.

Поскольку ранее при электрофоретическом исследовании МГТБ также обнаруживались белки, идентифицированные как изоформы сывороточного альбумина, и проявляющие свойства модулятора пептидов в структуре МГТБ, можно высказать предположение о том, что идентифицированные белки, обнаруженные в мицелии и у двустворчатых моллюсков могут также выполнять функцию белков-модуляторов, как и в случае с МГТБ, выделенными из тканей позвоночных, но в отсутствие альбуминов в тканях данных животных природа этих белков остается неясной. Проверка данного предположения, очевидно, выливается в отдельное исследование структуры данных белков и механизма их взаимодействия с пептидами.

3.4 Изучение специфической биологической активности

Полученные из тканей беспозвоночных препараты МП были изучены на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*, модели CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo* и модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo*. Данные модели ранее применялись для изучения МГТБ, выделенных из тканей млекопитающих и растений, и способствовали демонстрации специфической биологической

активности этих биорегуляторов, которая выражалась в стимуляции восстановительных и репаративных процессах в патологически поврежденных или травмированных тканях. Модель CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo* использовалась нами впервые не только с целью исследовать полученные препараты как гепатопротекторы, но и с целью сопоставления данных результатов с результатами исследования, полученными на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*.

3.4.1 Роллерное органотипическое культивирование ткани печени тритона *in vitro*

Биологическая активность фракций, выделенных из гепатопанкреаса краба.

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-макрофагов.

По краю печени тритона расположен т. н. кортикальный слой клеток, представляющий собой уложенные в несколько рядов структуры из соединительной ткани. Эта ткань плотная, с относительно небольшим объемом цитоплазмы клеток, в отличие от подлежащей паренхиматозной ткани, которая состоит из крупных гепатоцитов, пигментированных клеток-макрофагов, а также клеток, образующих кровеносные сосуды и желчные протоки. О пигментированных клетках стоит сказать особо.

Данные клетки функционируют как макрофаги, поглощая различные частицы, например, микроорганизмы, вирусы, а также осуществляют детоксикацию различных ксенобиотиков [124]. Как было установлено, дополнительная активация пигментированных клеток (увеличение их количества и миграции с образованием клеточных кластеров) связана с условиями обитания амфибий [124]. Она зависит от времени года (уменьшается к концу зимы и увеличивается весной и летом), от наличия и типа повреждающих воздействий на

животное – интоксикации, гипоксемии, травм, – и отражает защитную функцию организма [64, 65, 124]. 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 [68].

Ранее в исследовании действия МГТБ, выделенного из печени млекопитающего (крысы) на ткань печени амфибии (тритона), было продемонстрировано наличие тканевой специфичности действия МГТБ при отсутствии видовой специфичности. В этой работе было показано, что в тканевом экстракте печени крыс содержится МГТБ, который проявлял специфическое биологическое действие, а именно, дополнительно активировал пигментированные клетки печени тритона, в результате чего образовывались большие кластеры этих клеток, площадь которых отличалась от площади таковых в контрольных сериях [68].

Сама методика роллерного органотипического культивирования была выбрана из следующих соображений. Ранее было установлено, что для проявления биологического действия МГТБ необходимы, во-первых, сохранение целостности межклеточного пространства и структуры ткани [24, 125]; во-вторых, активация клеточных источников регенерации, которая наблюдается в условиях отсутствия воздействия на ткань адгезионного сигнала (роллерный тип культивирования) [52, 53]. Именно в этих условиях проявляется протекторное действие МГТБ на ткань – увеличение жизнеспособности клеток, сохранение межклеточных адгезионных взаимодействий, поддержание целостности структуры ткани [1]. Поскольку ранее на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона исследовали в основном МГТБ, выделенные из печени млекопитающих [126], одной из задач этого исследования являлось изучение специфической активности биорегулятора из ткани беспозвоночного (низшего) животного на ткани позвоночного (высшего) животного.

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 (рисунок 27, таблица 6) 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. В опытных точках, для МП из гепатопанкреаса краба и МГТБ печени крысы наблюдалась тенденция к перераспределению пигментированных клеток в зонах кроветворения вокруг сосудов, а также в краевой области печени. Подобную картину наблюдали ранее в экспериментах на этой модели с использованием МГТБ печени [68].

Следует отметить, что лекарственное средство Эссенциале форте также проявляло активность на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*. Таким образом, применяемый в медицине гепатопротектор проявлял на данной модели биологическое действие, сходное с действием фракций, выделенных из гепатопанкреаса краба и печени млекопитающих. Полученные данные позволяют сделать предположение о том,

что модель роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro* может быть использована для скрининга веществ на проявление ими гепатопротекторного действия.

Таблица 6. 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)	Площадь \pm ст. откл., (%)*
1	Нативная печень тритона	-	4,78 \pm 0,5
2	Контроль (без добавления препаратов)	-	5,16 \pm 0,07 (p<0,05**)
3	Эссенциале форте	10 ⁻⁵	5,41 \pm 0,08 (p<0,05***)
4	Супернатант тканевого экстракта печени крысы	10 ⁻¹²	5,52 \pm 0,8 (p<0,05***)
5	Супернатант тканевого экстракта гепатопанкреаса краба	10 ⁻¹⁰	5,51 \pm 0,06 (p<0,06***)

*-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 %);

** - в сравнении с нативной тканью; степень достоверности с применением критерия Манна-Уитни;

***- в сравнении с контрольной группой; степень достоверности с применением U-критерия Манна-Уитни.

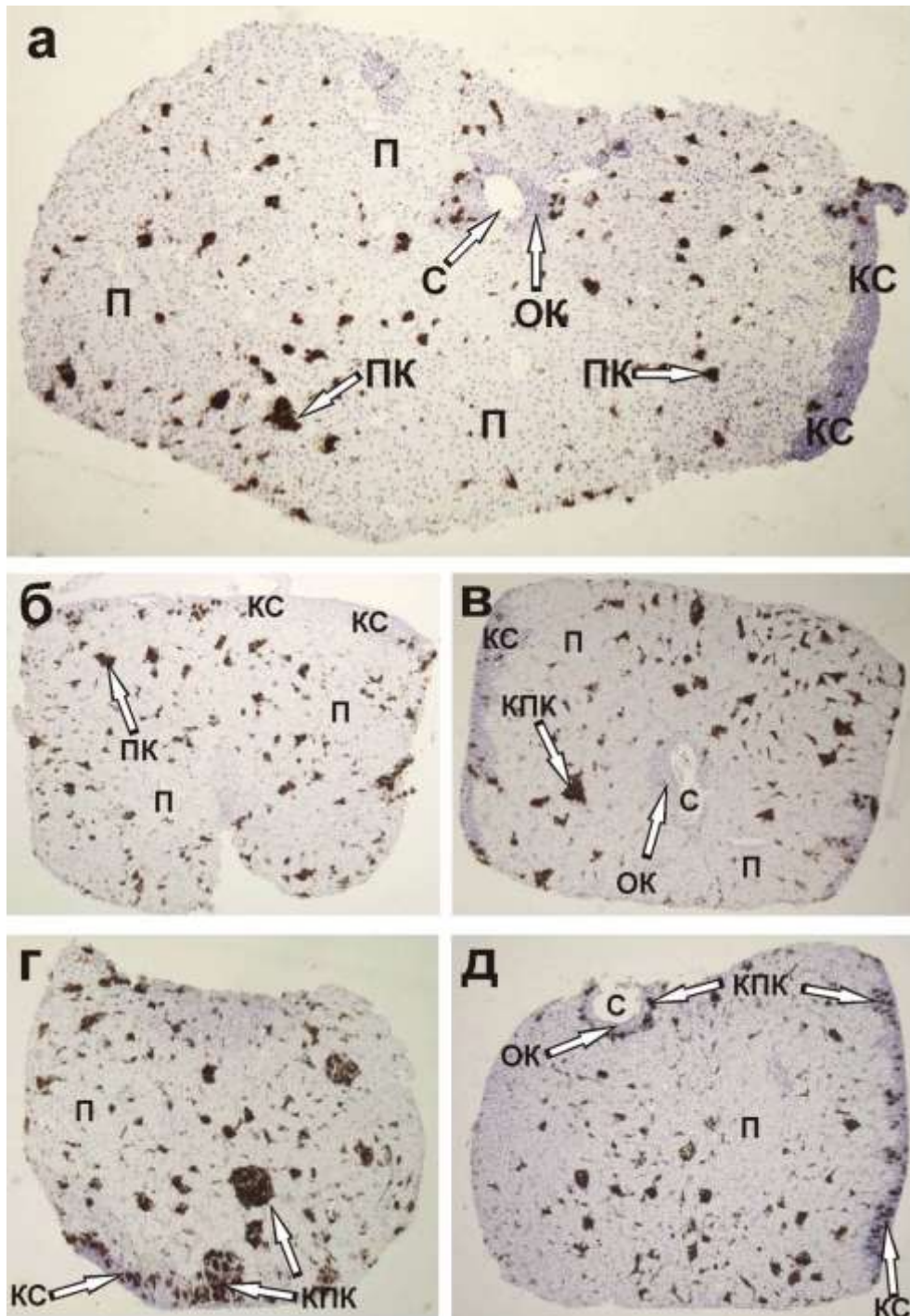


Рисунок 27. Гистологические срезы ткани печени тритона. а) – нативная ткань; б) – контроль; в) – культивирование с эссенциале форте; г) культивирование с МГТБ печени крысы; д) культивирование с супернатантом, выделенным из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба; отмечены стрелками и буквами: П - паренхима печени; КС - кортикальный слой; С – кровеносный сосуд; ОК - область кроветворения вокруг сосуда; ПК – пигментированные клетки; КПК – кластеры пигментированных клеток.

В отдельном эксперименте изучали биологическое действие фракций, полученных после обращенно-фазовой ВЭЖХ супернатанта, выделенного из тканевого экстракта панкреаса краба. 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 7), что выраженную биологическую активность проявляли: фракция супернатанта, а также ВЭЖХ-фракции 2, 3, 6. Все остальные ВЭЖХ-фракции не оказывали достоверного биологического действия. Примечательно, что на данной модели не проявляла активности объединенная пептидная фракция. Но наибольший эффект на пигментированные клетки печени тритона оказал восстановленный комплекс, полученный при взаимодействии объединенной пептидной фракции и осадка, который образовался после высаливания тканевого экстракта. Полученные данные указывают на высокую вероятность высказанного выше предположения (раздел 3.2) о роли щелочной фосфатазы как белка-модулятора для МП гепатопанкреаса краба.

На модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro* были изучены фракции, полученные из культуральной среды микромицелия *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 [67].

Таблица 7. 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)
Объединенная пептидная фракция	-	1,07±0,16 (p>0,5)
Пептидная фракция + осадок (восстановленный комплекс)	-	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, относительно площади среза (в %);

** - достоверность рассчитана с применением U-критерия Манна-Уитни.

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

Результаты данного исследования представлены в таблице 8. Они 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 4). Учитывая тенденцию пептидов к образованию межмолекулярных ассоциатов, можно предположить, что в данном случае образовался пептидный комплекс, который проявлял выраженную биологическую активность. На наш взгляд, эти данные показывают, что во фракциях, выделенных из *Fusarium s.* и ткани млекопитающих, присутствуют вещества, сходные по физико-химическим свойствам и характеру биологического действия. На основании этих свойств и проявления биологической активности в СМД можно предположить, что выделенные из *Fusarium s.* МП являются одним из компонентов присутствующего там МГТБ.

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 9).

В данном случае были исследованы дозы, в которых эти вещества проявляли мембранотропную активность (рисунки 8–13). На наш взгляд, полученные данные еще раз указывают на тканеспецифический характер активности, проявляемой МП, выделенными из тканей беспозвоночных животных.

Таблица 8. Влияние супернатанта и ВЭЖХ-фракций, выделенных из культуральной среды гриба *Fusarium s.*, 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 (%)*
Интактная печень тритона	-	0,89±0,04
Контроль	-	0,79±0,05 (p>0,5)
Супернатант, выделенный из культуральной среды гриба <i>Fusarium Sambucinum</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 среза (в %);

** - достоверность рассчитана с применением U-критерия Манна-Уитни.

Таблица 9. 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±0,12
Супернатант, выделенный из экстракта жемчужницы	10 ⁻¹¹	1,35±0,16; (p>0,5)
Супернатант, выделенный из экстракта мидий	10 ⁻¹¹	1,35±0,18; (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 среза (в %); достоверность рассчитана с применением U-критерия Манна-Уитни

3.4.2 Экспериментальный фиброз печени крыс *in vivo*

Мембранотропные фракции, проявившие активность на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона, были изучены далее на модели патологии печени у млекопитающих – CCl₄-индуцированном фиброзе печени крыс *in vivo*. Данная модель является широко распространенной для исследования острых и хронических патологических процессов, возникающих в печени млекопитающих в результате воздействия гепатотоксина, а также для скрининга биологически активных веществ как гепатопротекторов [85, 127–129]. Процесс фибротических изменений в ткани печени сложен, в нем участвуют несколько типов клеток (рисунок 28). Прежде всего, это звездчатые клетки печени

и клетки Купфера, а также непосредственное участие в этом процессе принимают эндотелиальные синусоидальные клетки и сами гепатоциты [130].

Звездчатые клетки печени (клетки Ито) – клетки мезенхимного происхождения, они находятся в пространстве Диссе и являются основным депо ретиноидов в печени. При воздействии факторов воспаления, например TGF- β , TNF-1, интерлейкина-1, эти клетки переходят в активированное состояние. Это является критическим моментом в иницировании процесса фиброза, который сопровождается пролиферацией и миграцией данных клеток, их трансформацией в миофибробласты и выработкой ими большого количества коллагена [130]. При этом сам процесс фибротических изменений в ткани нельзя рассматривать только в аспекте репарации поврежденных тканей как некий конечный результат ответа ткани печени на повреждающее воздействие. Коллаген I и III типа – основной продукт звездчатых клеток, а также некоторые другие экспрессируемые ими компоненты ВКМ, формируют в ткани печени новое, патологическое состояние межклеточного пространства. Эта стадия развития фиброза является обратимой: клетки печени, реагируя на образующийся «патологический» ВКМ, вырабатывают вещества, не только препятствующие его образованию, но и разрушающие его – матриксные металлопротеиназы (ММП) [131]. Поэтому на данной стадии особенно эффективно действие гепатопротекторов, стимулирующих процессы торможения и уничтожения вновь образующегося ВКМ, а потому поиск и исследование их действия является исключительно актуальным. Наиболее перспективные результаты при терапии фиброза печени были получены при направленном воздействии препаратов, нивелирующих повреждающее воздействие – в случае токсического, инфекционного или аутоиммунного поражения [129]. В модели CCl₄ – индуцированного фиброза непосредственным повреждающим фактором являются CCl₃ \cdot -радикалы, вызывающие окислительный стресс в клетках гепатоцитов [132]. Данная модель позволяет изучать патологические изменения в печени на отдельных стадиях, варьируя дозу и продолжительность введения гепатотоксина, благодаря чему возможно исследование как обратимой фазы развития фиброза, так и необратимой стадии – цирроза печени.

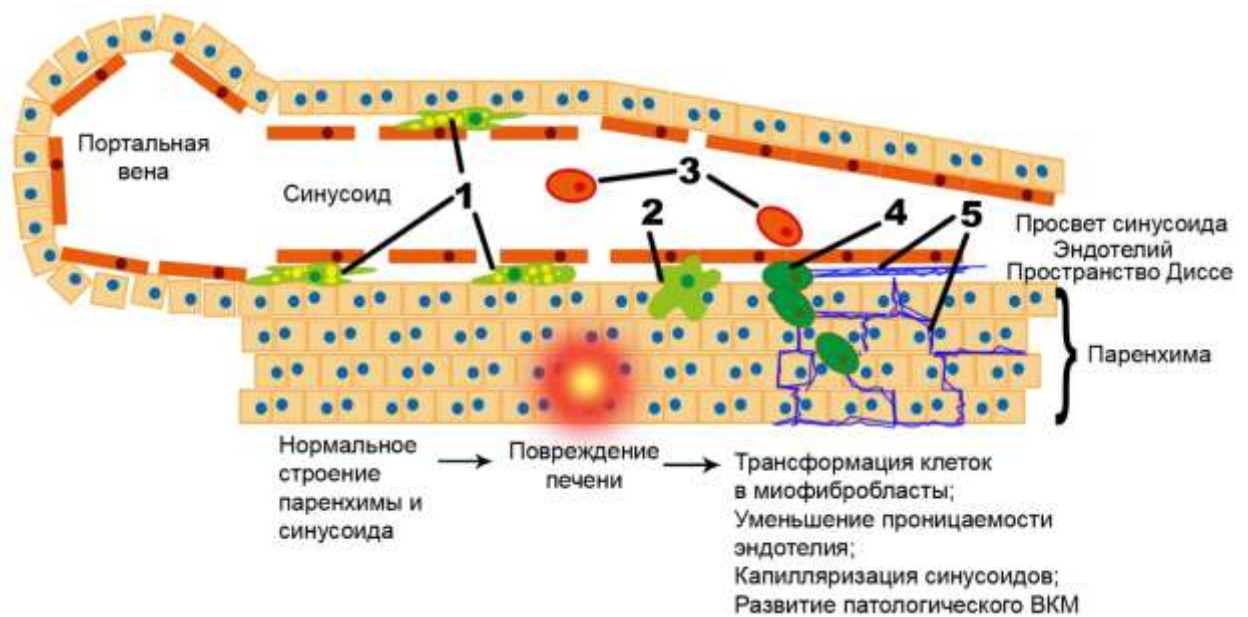


Рисунок 28. Развитие процесса фиброза в синусоиде печени. 1 – неактивные звездчатые клетки, 2 – активированные звездчатые клетки, 3 – стволовые клетки костного мозга, 4 – миофибробласты, 5 – фиброзные коллагеновые волокна

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 ранее из тканевого экстракта печени крыс, а также лекарственное средство Силимар, в основе фармакологического действия которого лежат его антиоксидантные свойства – а именно стабилизация ПОЛ в плазматических мембранах гепатоцитов [133] и способность стимулировать регенерацию печени за счет активации РНК-полимеразы.

На 60-й день эксперимента печень крыс всех групп характеризовалась значительным развитием жировой дистрофии (рисунок 29). Эти признаки практически исчезли на 120-е сутки (рисунок 30), но при окраске гематоксилин-эозином практически невозможно оценить степень развития фиброза. К тому же наличие очагов тотальной жировой дистрофии не позволяет сделать каких-либо заключений об общем состоянии паренхимы на сроке в 60 суток эксперимента.

Поэтому основное внимание при изучении гистологического материала было уделено срезам, окрашенным по Маллори (рисунки 31-32).

Обращает внимание значительное развитие фиброза (до стадии F3 по шкале METAVIR) у крыс в группах 1 (принимавших препарат, полученный из печени крыс) и 4 (фармакологический препарат Силимар) (рисунок 31 а, г). Как видно, наибольшим гепатопротекторным действием обладают препараты, выделенные соответственно из гепатопанкреаса краба и культуральной среды гриба *Fusarium* s.: на гистологических срезах видна менее выраженная жировая дистрофия по сравнению с контрольной и остальными опытными сериями, практически отсутствовали фиброзные образования (до стадии F1) в паренхиме. Однако у всех экспериментальных животных на этом сроке жировая дистрофия была выражена очень сильно, что мешало провести количественную оценку степени ее проявления. Следует отметить, что действие Силимара и препарата, выделенного из печени крыс, на этой стадии развития фиброза сходны и выражались в стимуляции образования фибротических изменений, а также в развитии жировой дистрофии. Важно, что на 120-й день наблюдали значительное уменьшение жировой дистрофии во всех группах.

Шкала METAVIR позволяет оценить состояние печени качественно, согласно четырем категориям. Для количественной оценки степени фиброзного поражения ткани печени крыс в эксперименте был проведен подсчет площади фибротической ткани в печени животных всех экспериментальных серий. Для этого снимки гистологических срезов, окрашенных по Маллори, обсчитывали с помощью ImageJ – свободно распространяемой программы для визуальной обработки изображений (см. раздел 2.13). Силимар и МГТБ печени крыс способствовали значительному уменьшению жировой дистрофии и торможению развития фиброза, по сравнению с контрольной группой животных, у которых фиброз продолжал развиваться. В целом при развитии процесса фиброза это объясняется фактом перерождения паренхимы, пораженной жировой дистрофией, в фиброзную ткань. Наиболее значительное гепатопротекторное действие оказал препарат, выделенный из гепатопанкреаса краба. При его воздействии наблюдали

почти полное отсутствие развития фиброза на протяжении всей второй половины эксперимента при сохранении редких очагов жировой дистрофии (рисунок 29, б). Возможно, это связано с предотвращением выработки избыточных коллагеновых структур и постепенной отменой процессов перерождения ткани. Препарат, выделенный из культуральной среды *Fusarium s.*, также тормозил развитие фиброза на 120-й день эксперимента, при этом не наблюдали признаков жировой дистрофии ткани печени [134, 135] (рисунки 31-32, таблица 10).

Таблица 10. Влияние исследуемых препаратов на развитие CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*

Группа животных	Исследуемый препарат	Площадь фиброзной ткани / площадь гистологического среза (%);	
		60 дней эксперимента	120 дней эксперимента
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

*-параметр, отражающий площадь пигментированных клеток в печени тритона; рассчитывается как отношение площади пигментированных клеток, занимаемой на гистологическом срезе, по отношению к площади среза (в %); стандартное отклонение показано для bootstrap-анализа с длиной массива R=10000.

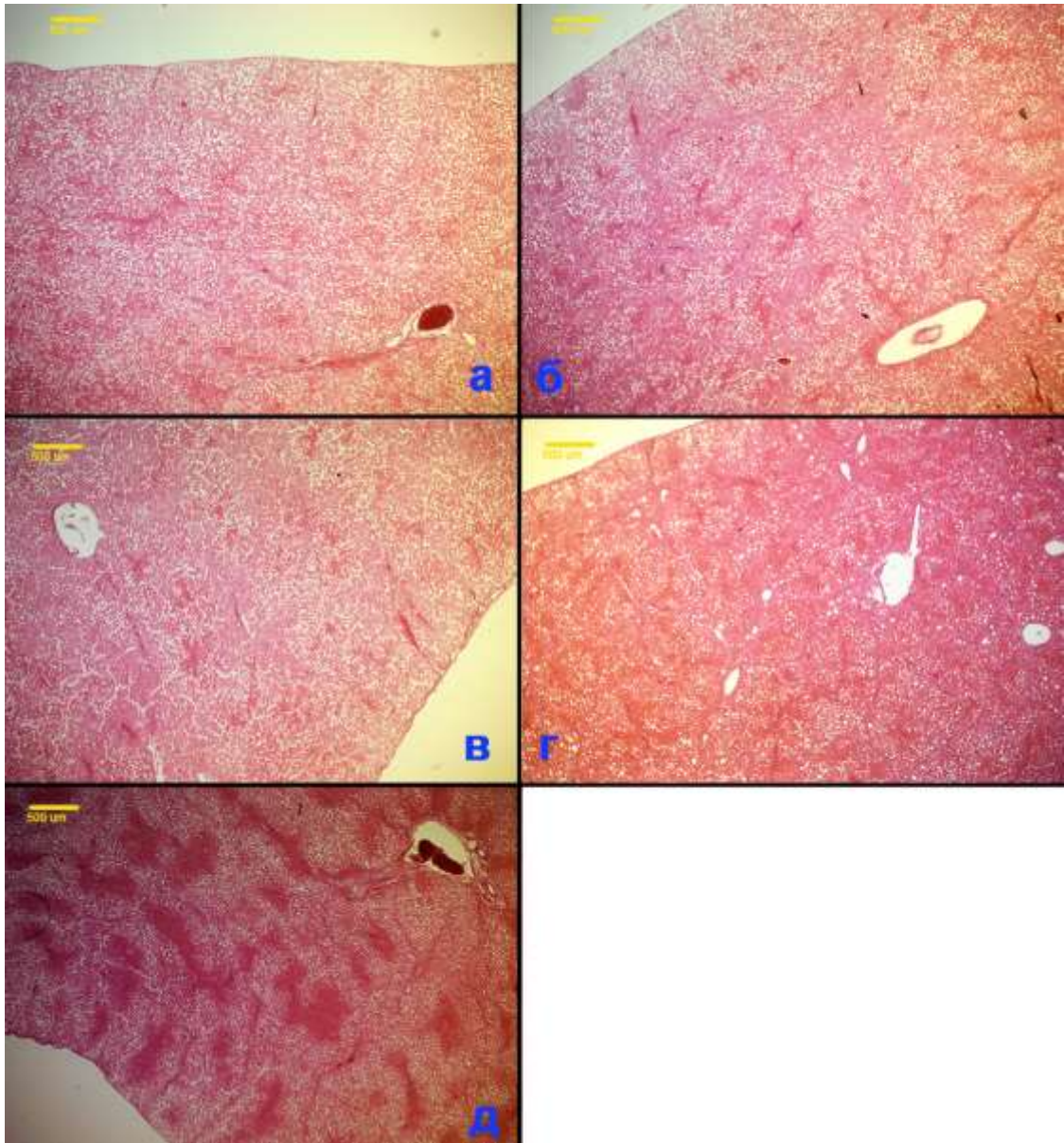


Рисунок 29. Гистологические срезы печени крыс групп №1 - 5 на 60-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза (окраска гематоксилин-эозином).

а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) - воздействие препарата супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.* (группа 3); г) воздействие фармакологического препарата Силимар (группа 4); контрольная группа (группа 5).

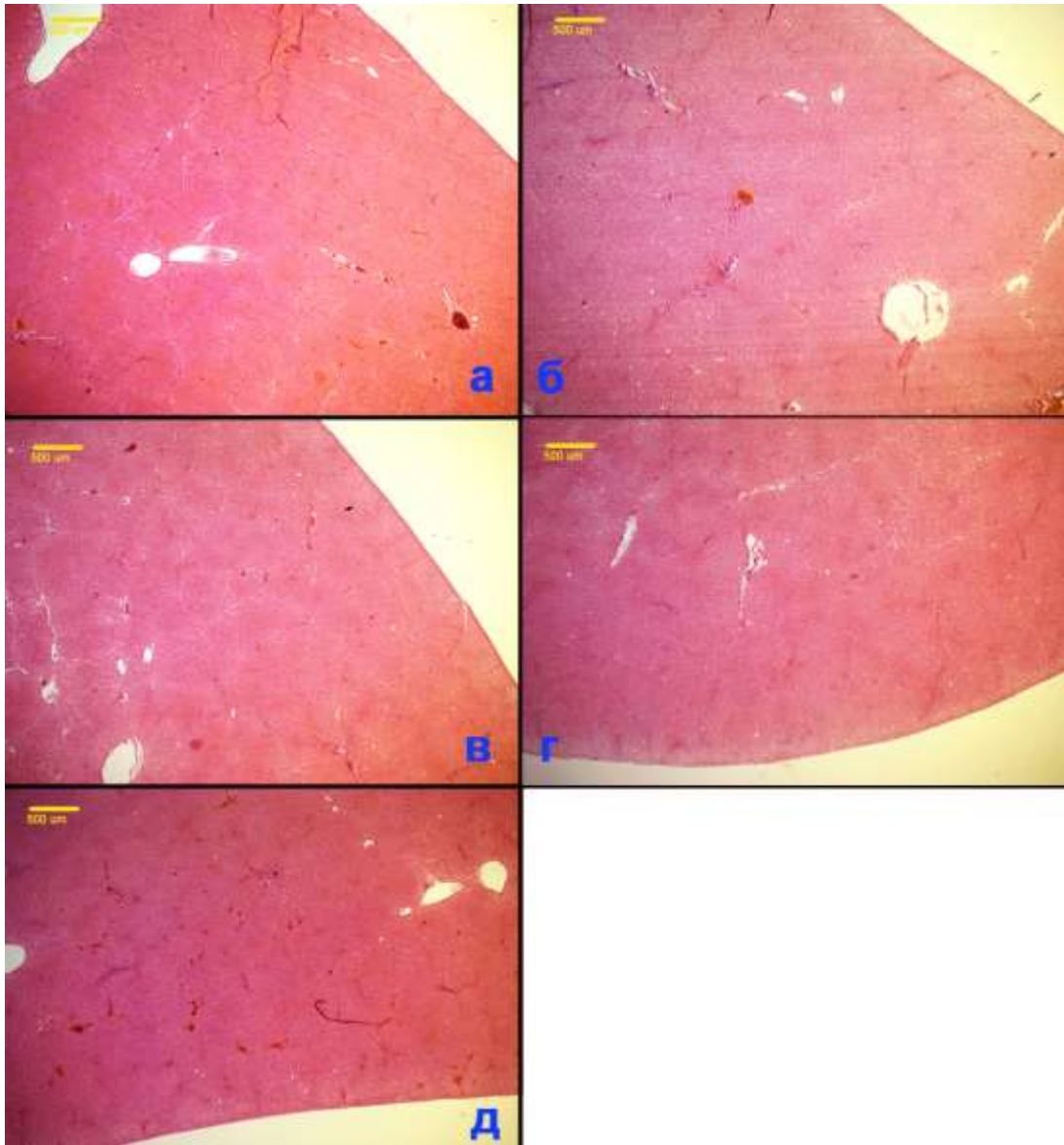


Рисунок 30. Гистологические срезы печени крыс групп №1 - 5 на 60-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза (гематоксилин-эозином).

а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) - воздействие препарата супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.* (группа 3); г) воздействие фармакологического препарата Силимар (группа 4); контрольная группа (группа 5).

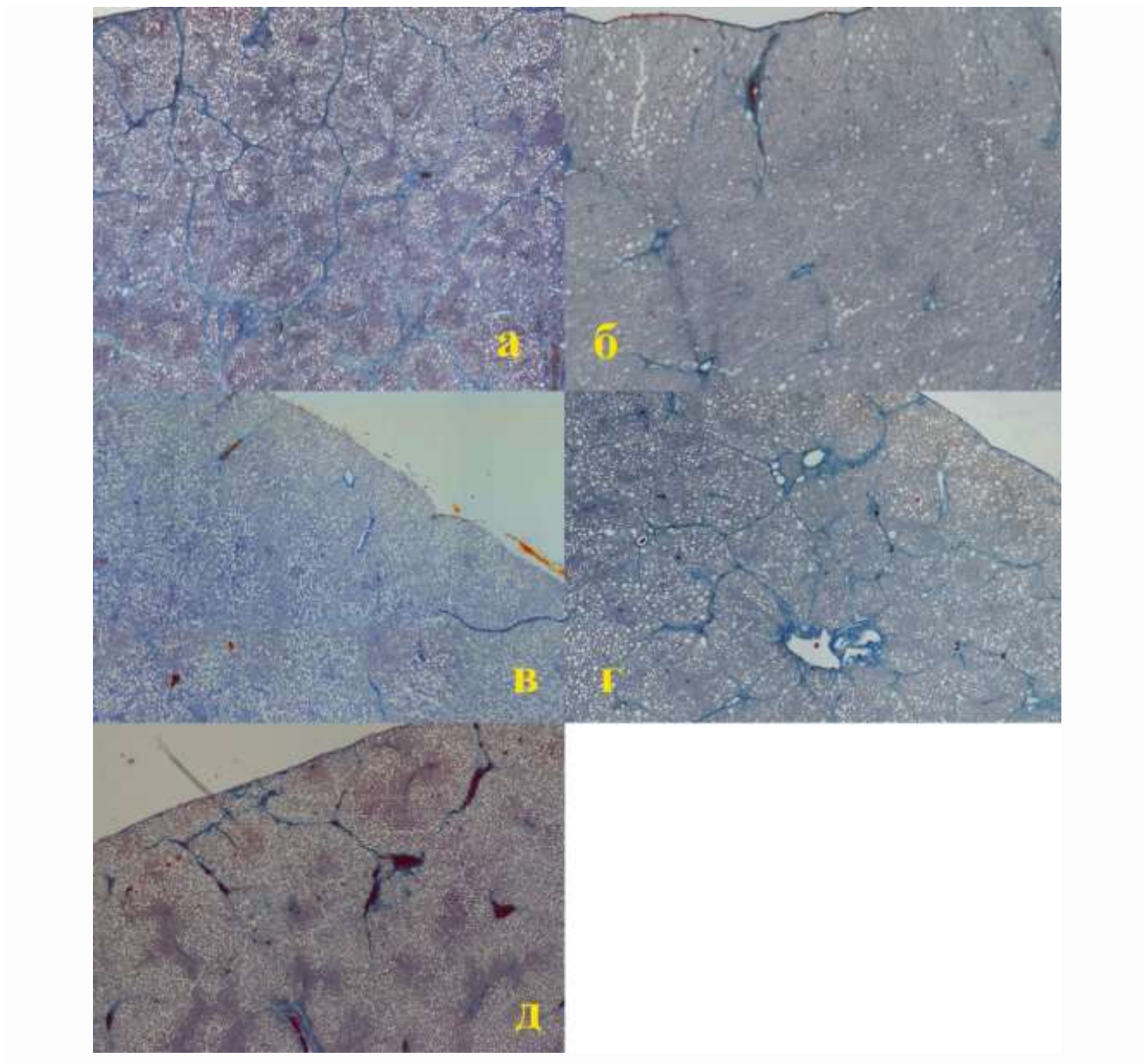


Рисунок 31. Гистологические срезы печени крыс групп №1 - 5 на 60-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза (окраска по Маллори).

а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) - воздействие препарата супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.* (группа 3); г) воздействие фармакологического препарата Силимар (группа 4); контрольная группа (группа 5). Синим цветом специфически окрашиваются септы, образованные коллагеновыми волокнами в процессе фибротизации ткани.

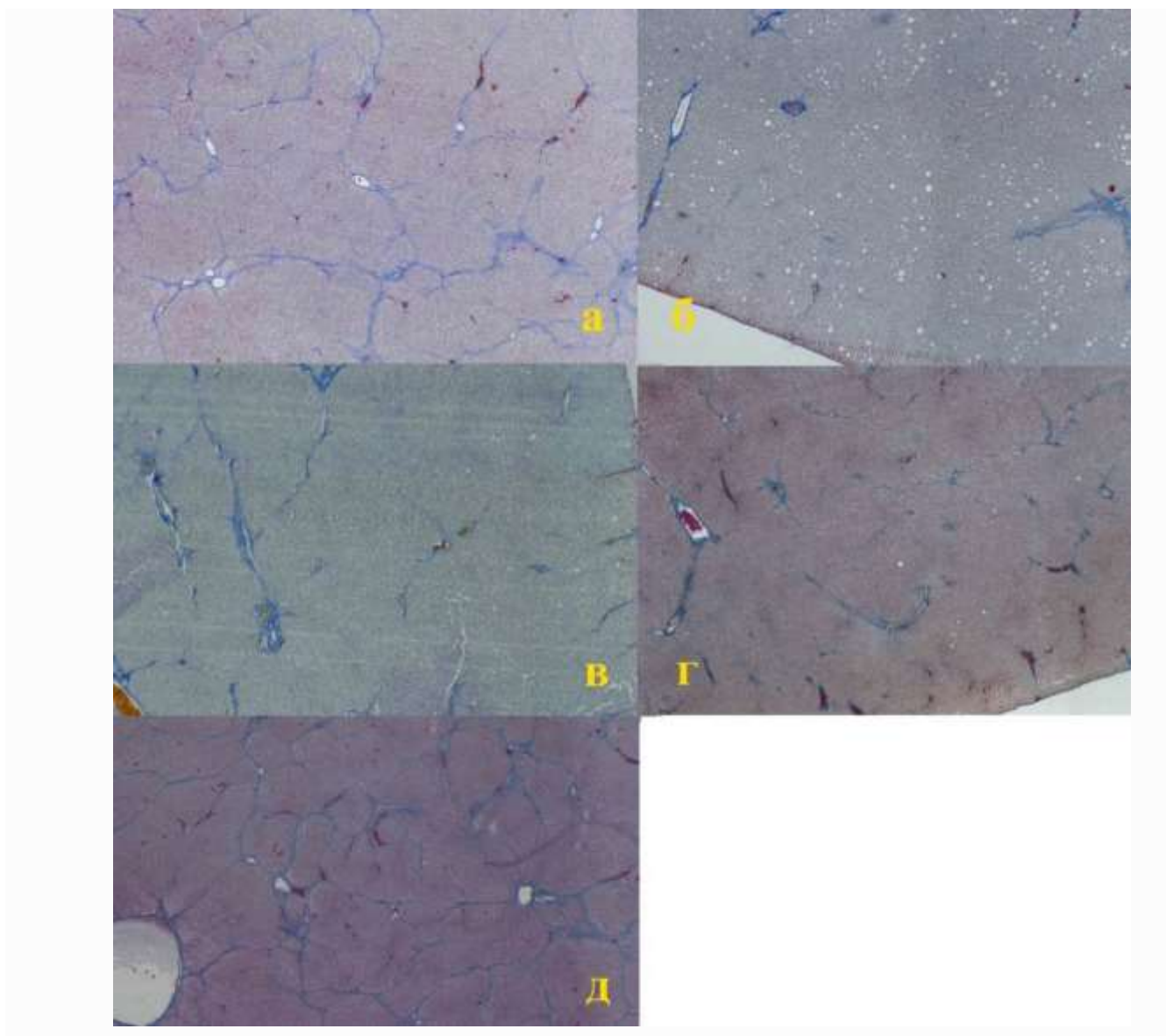


Рисунок 32. Гистологические срезы печени крыс групп №1 - 5 на 120-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза (окраска по Маллори).

а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) - воздействие препарата супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.* (группа 3); г) воздействие фармакологического препарата Силимар (группа 4); контрольная группа (группа 5). Синим цветом специфически окрашиваются септы, образованные коллагеновыми волокнами в процессе фибротизации ткани.

Анализ полученных результатов указывает, 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 не только способствовал значительному торможению развития фиброза на начальной стадии и уменьшению степени жировой дистрофии, но и поддерживал состояние паренхимы во второй части эксперимента, когда отсутствовало воздействие гепатотоксина. 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.

Биологическое действие ряда гепатопротекторов на ткань печени тритона в модели роллерного органотипического культивирования

Результаты, полученные с использованием двух экспериментальных моделей – роллерного органотипического культивирования 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. Оба исследуемых препарата проявляли гепатопротекторное действие: в первом случае – активируя клетки, проявляющие защитные функции в печени амфибий; во втором – препятствуя развитию патологического процесса путем торможения фибротических образований и развития жировой дистрофии в печени млекопитающих.

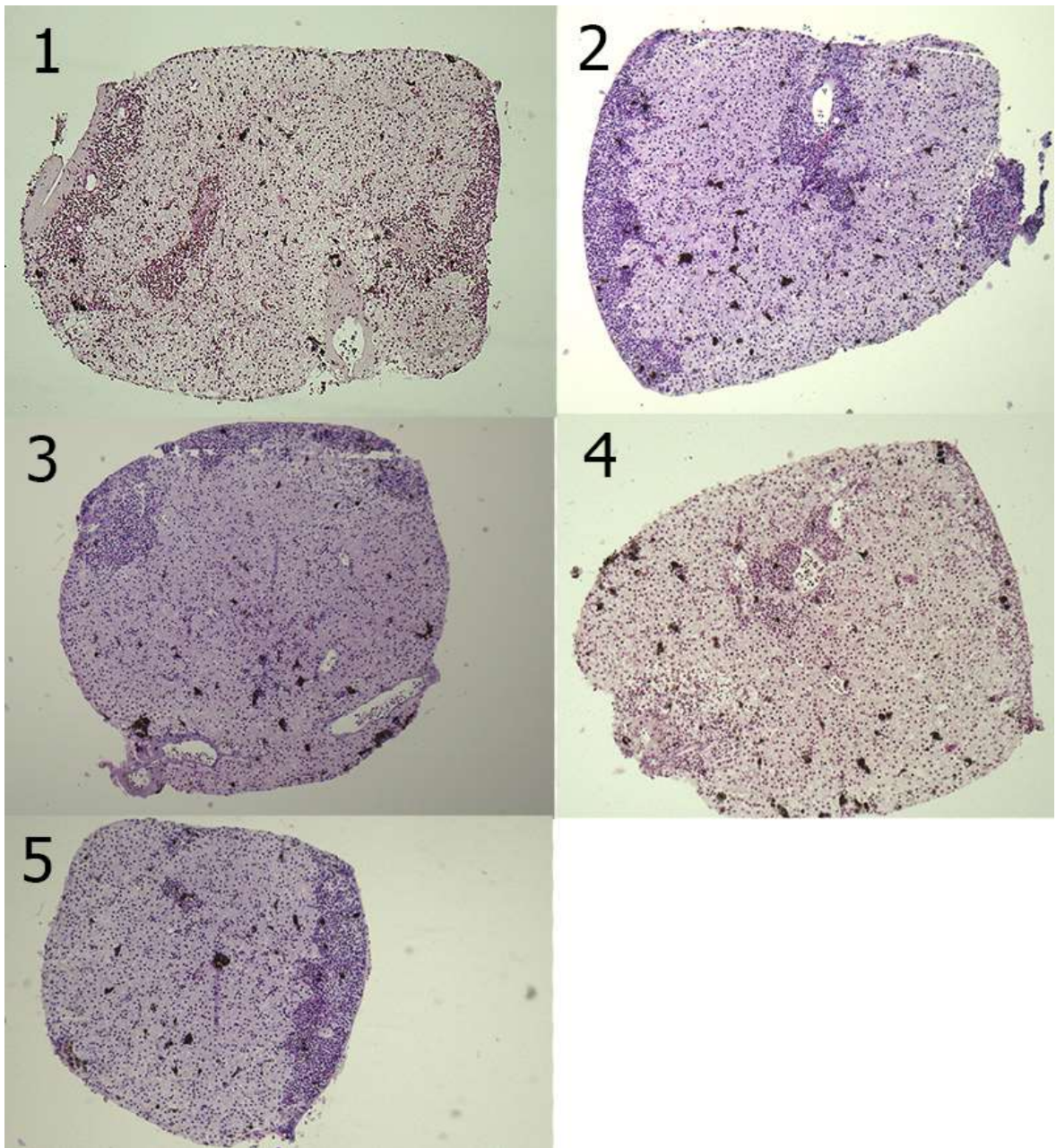


Рисунок 33. Гистологические срезы ткани печени тритона.

1) – культивирование с препаратом Галстена; 2) – культивирование с препаратом Лив 52; в) – культивирование с препаратом Эссенциале; г) культивирование с препаратом Гепарис клиник; 5) контроль.

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. 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. Полученные результаты приведены на рисунке 33 и в таблице 11. Согласно этим данным, действие изученных препаратов на данной модели, кроме случая с препаратом Гепарис клиник, заключалось в стимуляции увеличения количества пигментированных клеток в печени тритона при культивировании.

Таблица 11. 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, по отношению к площади среза (в %);

** -достоверность рассчитана с применением U-критерия Манна-Уитни

Следует отметить, что данные препараты являются различными по заявленным действующим веществам и механизму действия. Препараты группы Эссенциале в качестве активного вещества используют фосфолипиды и ненасыщенные жирные кислоты. Фосфолипидные препараты считаются важным

антиоксидантным фактором, препятствующим перекисному окислению липидов и, соответственно, повреждению мембран гепатоцитов [136]. Препараты Гепарис клиник, Галстена и Лив52 являются по сути растительными биологически активными добавками. При этом Гепарис клиник и Галстена позиционируются как гомеопатические препараты, используя действующие вещества в СМД и гомеопатических разведениях.

Для обсуждения проблемы поиска, исследования, разработки различных биологически активных веществ, обладающих гепатопротекторным действием, нужно отметить следующее. В медицинской практике зарубежными медиками используются в основном лекарственные препараты, основанные на фосфолипидах. Это связано с представлением о повреждающем действии определенных факторов (токсины, вирусы, свободные радикалы и др.) на структуру и свойства плазматических мембран гепатоцитов. Считается, что экзогенное введение фосфолипидов – основных структурных компонентов ПМ, будет способствовать поддержанию жизнеспособности и функции клеток печени. В нашей стране разработан и широко применяются ряд препаратов на основе биологически активных веществ растительного происхождения (расторопша, одуванчик, тысячелистник и т. д.). При этом фактически они являются БАДами, поскольку в настоящее время недостаточно разработаны критерии их фармакологической активности как гепатопротекторов [137]. Очевидно, это связано со сложной функцией печени как железы, осуществляющей детоксикацию ксенобиотиков и метаболитов в организме, а с другой – как органа биосинтеза важнейших веществ, поддерживающих метаболизм. Тем не менее, до сих пор традиционными являются модели CCl_4 (или $CHCl_3$)-индуцированного фиброза печени, который является патологией, развивающейся в цирроз. В связи с этим, очевидно, некорректным было бы ожидать на данных моделях одинакового проявления гепатопротекторного свойства у всех известных препаратов данного назначения. Однако приведенные в таблице 10 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 [138] Силимар, действие которого на данной модели и традиционной модели CCl₄-индуцированного фиброза печени у крыс было продемонстрировано нами ранее (рисунки 29 - 32, таблица 11). Суммирование этих результатов дает основания для рекомендации модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* в качестве первичного скрининга биологически активных веществ для выявления их возможного гепатопротекторного действия.

3.4.3 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*. Ранее полученные результаты показали, что МГТБ, выделенные из различных тканей млекопитающих, обладают способностью тканеспецифично стимулировать процессы восстановления и репарации в поврежденных тканях [1, 139]. Для некоторых МГТБ также было показано, что в основе такого их действия лежит способность дополнительно активировать клеточные источники регенерации в соответствующей ткани [56]. Например, выделенный из сыворотки крови МГТБ на модели экспериментальной раны кожи у мышей не только стимулировал эпителизацию раны, но и способствовал полному восстановлению структуры кожи в области раны [71, 72].

В этом исследовании в качестве объекта сравнения для изучения биологического действия МП тканей двустворчатых моллюсков был выбран супернатант, выделенный из тканевого экстракта голубых мидий –морских двустворчатых моллюсков. В качестве еще одного препарата сравнения в данном эксперименте был взят МГТБ сыворотки крови, для которого ранее было показано выраженное ранозаживляющее и регенерирующее действие на данной модели.

Контрольными являлись группы животных с не обрабатываемой раной и раной, обрабатываемой физиологическим раствором.

Исследование препарата, выделенного из пресноводной жемчужницы Margaritifera m.

Как показано на рисунках 34–36, кроме препарата, выделенного из пресноводной жемчужницы, во всех случаях наблюдали эпителизацию области раны с образованием соединительнотканного рубца, состояние которого не отличалось от состояния рубца в контроле.

В контрольных группах наблюдаются плотные тяжи коллагеновых волокон, образующие фиброзный рубец. Наблюдается отслоение эпителия от дермы и очаги воспаления в дерме.

В группе МГТБ сыворотки крови наблюдается полная реэпителизация, отсутствие развития фиброзного рубца в дерме, восстановление волосяных фолликулов.

В отличие от животных контрольных групп, при воздействии фракции, выделенной из пресноводной жемчужницы, происходила полная реэпителизация области раны и наблюдали стимуляцию ранозаживления. Распределение коллагеновых волокон в дерме имеет рыхлую структуру. Интересно отметить, что восстановление эпителия происходило за счет связанных с эпидермисом и разворачивающихся в него эпителиальных мешочков (рисунок 34). Данные структуры образованы одним слоем эпителия и представляют собой замкнутые сферические образования, образующиеся внизу дермального слоя [77]. 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 картины регенерации с таковой для экспериментального заживления ожоговых травм у безволосых мутантных мышей Hr^{hr}/Hr^{hr} в условиях *in vivo* [140].

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 [140].

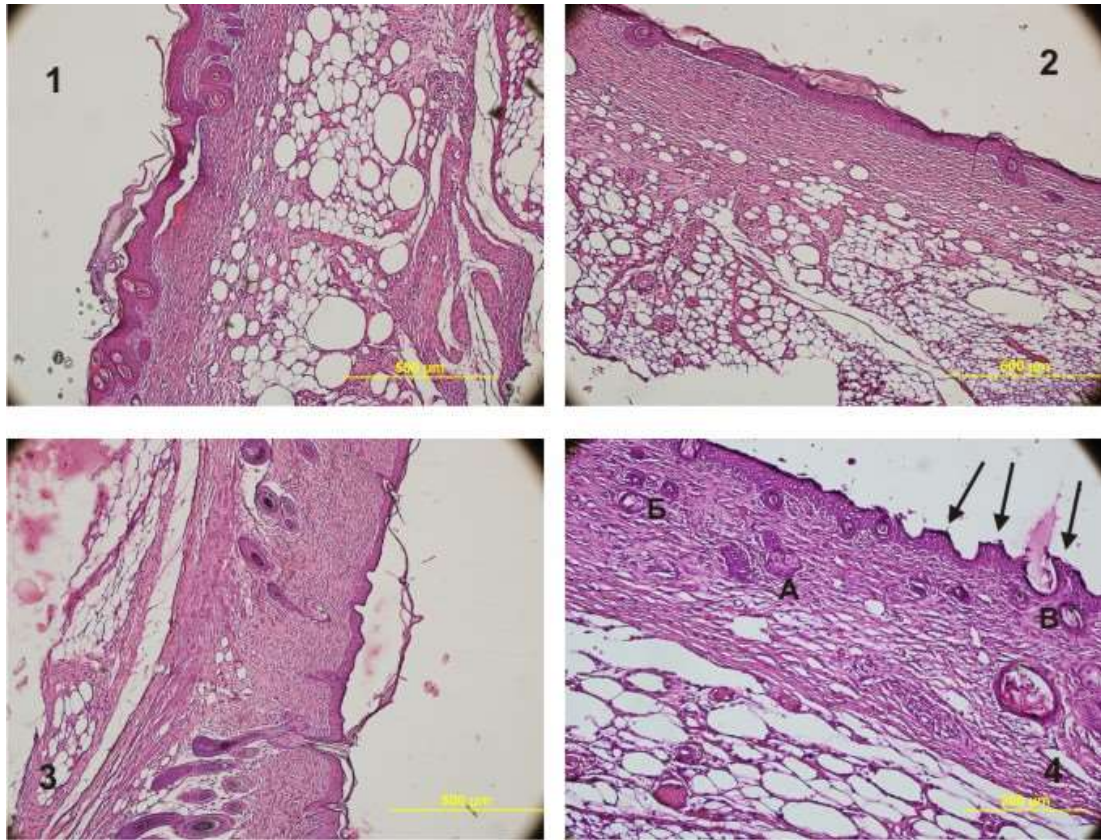


Рис 34. Гистологические срезы экспериментальной раны кожи мыши.

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, соотв. 10^{-14} мг белка/мл

Исходя из этого можно предположить, что регуляторные вещества, секретируемые глохидиями жемчужницы, влияют на пролиферацию и миграцию эпителия, в связи с чем дают активную реэпителизацию при экспериментальном ранозаживлении. Обнаруженная аналогия с механизмом ранозаживления у безволосых мышей может быть объяснена отсутствием волосяных фолликулов у глохидиев и в жабрах рыб, которые также отсутствуют и у мышей Hr^{hr}/Hr^{hr} в результате мутации, что приводит к сходному протеканию процесса реэпителизации.

Картина влияния фракции супернатанта, полученного из экстракта мидий, ничем принципиально не отличается от контрольной раны (рисунок 35). Отсутствуют признаки восстановления волосяного покрова, желез и их протоков. Дерма уплотненная, эпидермис утолщен и отслоен от дермы. Наблюдаются очаги воспаления в дерме. Таким образом, можно сделать вывод, что супернатант, полученный из экстракта мидий, не оказывает никакого влияния на процесс ранозаживления кожи у мышей *in vivo*.

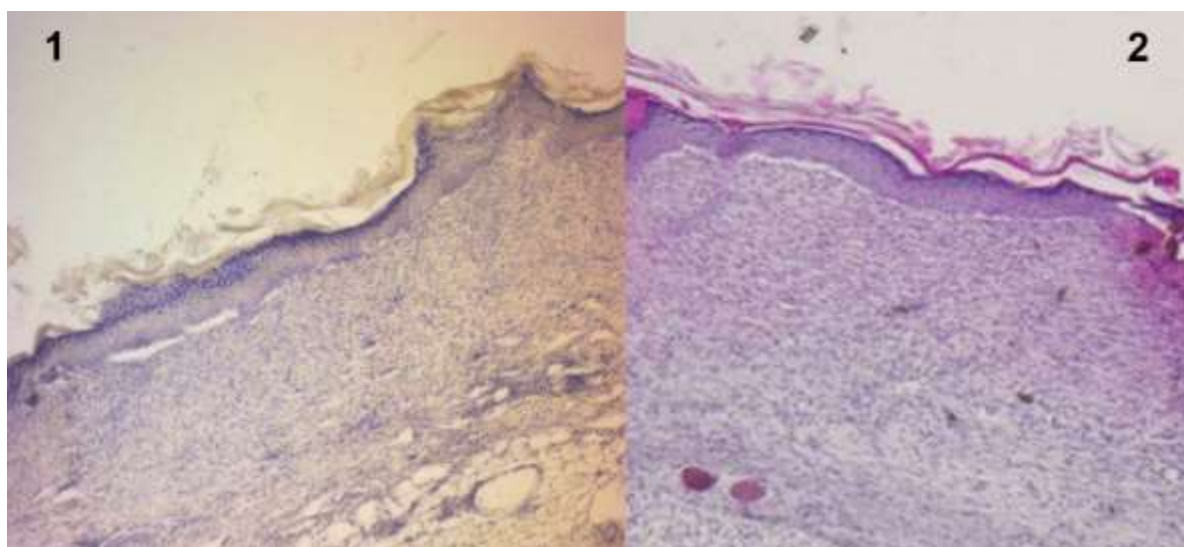


Рисунок 35. Гистологические срезы экспериментальной раны кожи мыши.

1 – контроль; 2 – действие супернатанта тканевого экстракта мидий в дозе, соотв. 10^{-12} мг белка/мл.

Итак, было продемонстрировано присутствие в тканях двустворчатых моллюсков пептидов, сходных по физико-химическим свойствам и характеру проявления мембранотропной активности с веществами группы МГТБ. Также показано различное влияние этих веществ на процесс заживления экспериментальной кожной раны у мышей: заживление раны в случае моллюска жемчужницы и отсутствие эффекта в случае мидий. Таким образом, полученные результаты указывают на наличие специфичности биологического действия препаратов, выделенных из различных видов двустворчатых моллюсков.

Проявление ранозаживляющего действия препаратом, выделенным из жемчужницы, очевидно, связано со своеобразием жизненного цикла этого

моллюска. Глохидии жемчужницы прикрепляются к жабрам лосося, при этом вокруг личинок образуются плотные эпителиальные капсулы, которые полностью покрывают их в жабрах в течение 24 часов. После созревания личинка покидает капсулу и выходит наружу для последующего оседания на дно водоема. В случае если объем заражения не критичен для жизнеспособности лосося, этот массовый выход глохидиев из капсул не приводит к возникновению тяжелых повреждений тканей рыбы, и последние достаточно хорошо переживают это событие. Следовательно, возможно, что глохидии, кроме стимуляции роста эпителия, также способны каким-то образом оказывать ранозаживляющий эффект на ткани рыбы, поскольку в противном случае выход личинок из жабр рыб мог бы приводить к их гибели и истощению популяции хозяина, которая напрямую влияет на возможность жемчужницы размножаться в данном ареале обитания [141].

Другие виды двустворчатых моллюсков, в том числе и голубые мидии, размножаются и развиваются за счет взаимного оплодотворения и развития молодых особей в крупных колониях – банках, которые расположены в местах постоянных течений, поставляющих кислород и питательные вещества в достаточном количестве. Стадия развития личинки-паразита в онтогенезе этих двустворчатых отсутствует.

На наш взгляд, подобное отличие пути развития пресноводной жемчужницы от остальных двустворчатых моллюсков является обстоятельством, определяющим ранозаживляющее свойство биологически активных веществ, вырабатываемых глохидиями.

Исследование препаратов, выделенных из гепатопанкреаса краба и культуральной среды Fusarium

На рисунке 36 представлены гистологические срезы, полученные на 11-е сутки эксперимента по ранозаживлению для исследуемых препаратов. Как видно, состояния ткани опытных и контрольных серий не различаются. Отсутствует нормальная структура ткани, дерма уплотненная, состоящая из плотных тяжей коллагеновых волокон. Эпидермис утолщен, отсутствуют протоки потовых и

сальных желез, волосяной покров и фолликулы. Наблюдается фиброзное перерождение жировой ткани с очагами воспаления во всех группах, за исключением *Fusarium s.*

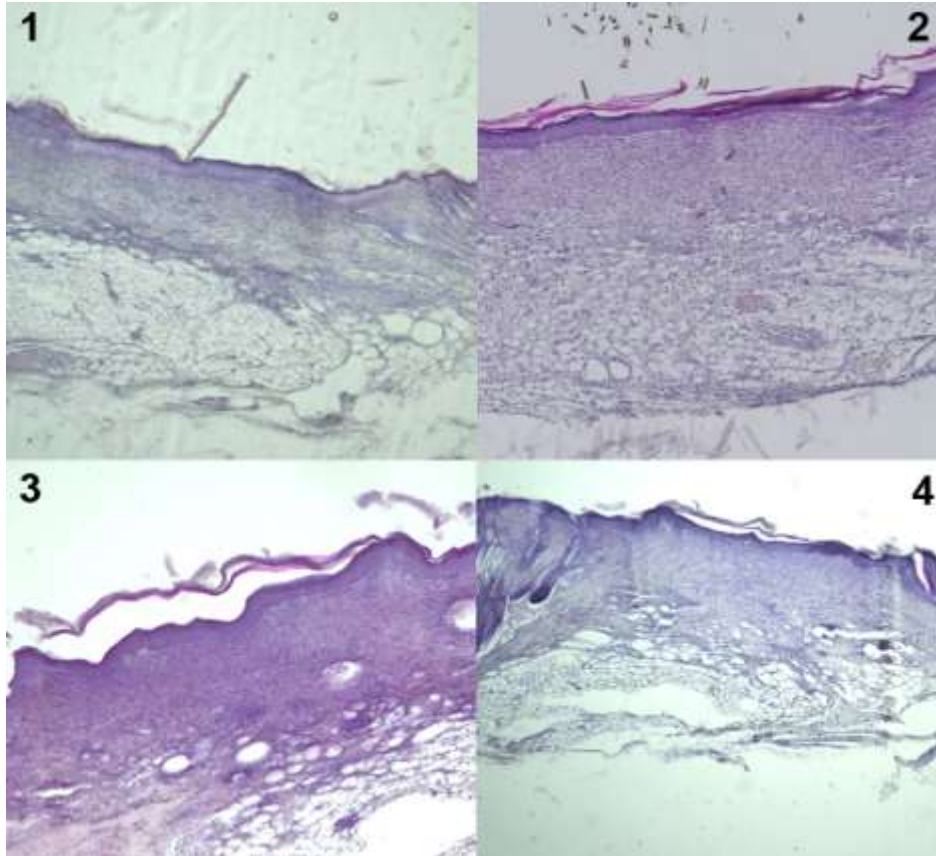


Рисунок 36. Гистологические срезы экспериментальной раны кожи мыши.

1 – контроль (сухая рана); 2 – действие физиологического раствора; 3 - действие супернатанта тканевого экстракта гепатопанкреаса краба в дозе, соотв. 10^{-10} мг белка/мл; 4 - действие супернатанта, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.*, соотв. 10^{-10} мг белка/мл

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 контроля.

Таким образом, только при исследовании фракции, полученной из моллюска пресноводной жемчужницы, на данной модели наблюдалось восстановление структуры кожи без образования соединительнотканного рубца. Для всех остальных препаратов, изученных в данной работе, наблюдалось заживление раны путем образования плотного соединительнотканного рубца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования веществ, выделенных из тканей морских беспозвоночных животных, а также культуральной среды гриба *Fusarium s.*, согласно методическому подходу, разработанному для изучения МГТБ, дают основания говорить об обнаружении в данных объектах мембранотропных пептидов, сходных по свойствам с пептидами, входящими в состав ранее изученных МГТБ.

Биологически активные МП были обнаружены в трех объектах исследования – гепатопанкреас краба, пресноводная жемчужница, культуральная среда *Fusarium s.* Помимо наличия характерных для МГТБ физико-химических свойств и мембранотропной активности, препараты, полученные из данных объектов, оказывали протекторное действие на ткани позвоночных животных при исследовании специфической активности. Обнаруженное действие препарата, выделенного из гепатопанкреаса краба, а также препарата, выделенного из культуральной среды *Fusarium s.*, на двух моделях – роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro* и CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*, свидетельствует о проявлении ими гепатопротекторного свойства. На модели культивирования печени тритона оба препарата активировали пигментированные клетки печени, которые проявляли защитные свойства [64]. На модели CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo* оба данных препарата эффективно тормозили развитие фиброза у крыс. На этой модели можно выделить две стадии исследования этих препаратов: первая – в течение 60 дней экспериментальные животные наряду с гепатотоксином принимали изучаемые препараты; в течение следующих 60 дней – только изучаемые препараты. На первом этапе изучалось протекторное действие препаратов на ткань фоне введения гепатотоксина; на втором – изучали их регенерирующее действие. Следует отметить, что исследуемые МП, а также МГТБ, выделенный из печени крыс, действовали по-разному: наиболее эффективным оказался препарат, выделенный из гепатопанкреаса краба. Как и для всех

остальных, на первом этапе его протекторное действие практически не обнаруживалось – активно развивалась жировая дистрофия ткани, обнаруживались начальные признаки фиброза. На второй стадии эксперимента все исследуемые препараты сдерживали развитие фиброза в печени, практически отсутствовали признаки жировой дистрофии. На наш взгляд, различающееся действие исследованных МП и МГТБ, выделенного из печени крыс, связано с их различным влиянием на клеточные источники регенерации в печени (см. раздел 3.6.2).

Результаты роллерного органотипического культивирования тканей показали, что кроме тканеспецифического действия фракций, выделенных из гепатопанкреаса краба и культуральной среды гриба *Fusarium s.* на пигментированные клетки печени амфибий, отмечается протекторное действие обеих фракций на ткань печени в целом – поддержание межклеточных адгезивных взаимодействий, а также структуры ткани. В этом данные фракции проявляют сходство в характере биологического действия с МГТБ, ранее выделенным из ткани печени крыс [118]. Более того, на модели фиброза печени крыс было показано уменьшение степени фибротических поражений печени. В отличие от стимуляции клеточных процессов внутри обособленного фрагмента ткани при роллерном культивировании *in vitro*, выраженное протекторное действие *in vivo* говорит о влиянии исследуемых веществ на органно-тканевой уровень регуляции.

Еще один важный аспект исследования заключался в наличии соответствия друг другу моделей, использованных для изучения гепатопротекторных свойств изучаемых в этой связи МП и МГТБ. Модель роллерного органотипического культивирования печени амфибий является удобной и адекватной по целому ряду параметров для выяснения наличия гепатопротекторной активности. К этим преимуществам можно отнести сравнительно небольшое время проведения эксперимента, жизнеспособность культуры, наглядность и возможность количественной интерпретации полученных данных (используя площадь пигментированных клеток на срезах). В то же время экспериментальные модели патологий печени, к примеру, CCl_4 -индуцированный фиброз, являются многократно опробованными и достоверными, но достаточно трудо- и

ресурсоемкими. В настоящей работе было продемонстрировано, что данные, полученные на модели роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона *in vitro*, согласуются с данными, полученными на модели CCl_4 -индуцированного фиброза, причем это показано также на ряде коммерческих лекарств-гепатопротекторов. Это позволяет говорить о том, что роллерная органотипическая культура ткани печени тритона *in vitro* адекватна для изучения гепатопротекторных свойств веществ и может быть использована для скрининга перспективных биологически активных веществ для создания лекарственных препаратов на их основе.

Все исследуемые в этой работе препараты МП проявляли активность, характеризующуюся тканевой специфичностью. Например, на модели ранозаживления кожи оказался активным только препарат, выделенный из пресноводной жемчужницы.

В данной работе впервые было продемонстрировано присутствие МП, проявляющих ряд свойств МГТБ, у низших животных, что позволяет сделать фундаментальный вывод об общности изучаемого регуляторного процесса, включающего в себя биорегуляторы данной группы как основных участников для всех живых организмов. Продемонстрированный на нескольких моделях характер биологического действия, а именно стимулирование восстановительных процессов в патологически измененных тканях, предполагает их определенную функцию в живых организмах. Биорегуляторы группы МГТБ можно назвать «тонкими настройщиками» гомеостаза, поскольку их действие направлено на возвращение нормального состояния и структуры ткани, подвергшейся повреждению или патологическому процессу. Обнаруженная способность МГТБ проявлять биологическую активность в СМД по всей видимости, указывает на их способность оказывать влияние на свойства воды биологических жидкостей, в том числе межклеточного пространства [84].

При этом остается открытым вопрос о конкретной мишени для изучаемых биорегуляторов. Их протекторный эффект является следствием активации клеточных источников регенерации [55, 60]. При применении изучаемых

биорегуляторов данной группы, очевидно, реализуется принципиально иной механизм заживления, при котором происходит восстановление структуры поврежденной ткани без образования соединительнотканного рубца [70, 71].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что проявляющие мембранотропную активность пептиды обнаружены в организме как позвоночных, так и беспозвоночных животных, а также в микроскопических грибах. В то же время остается открытым вопрос о строении изученных в работе биорегуляторов – идентификация пептидов, входящих в их состав, наличие и природа вещества-модулятора активности пептидов, выделенного из тканей низших животных. Кроме этого, механизм действия биорегуляторов, их самосборка в надмолекулярные ассоциаты и роль воды в этом процессе также являются важными нерешенными вопросами в этой области. Это является актуальной проблемой для исследования МГТБ в будущем.

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) Установлено, 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) Обнаружено, 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) 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) Мембранотропные пептиды, выделенные из тканей беспозвоночных животных, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова, В.П. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков И.А. – Saarbrucken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 P.
2. Ямскова, В.П. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков – М.: МАКС Пресс, 2009. – 84 С.
3. Modjanova, E.A. Alteration of properties of cell contacts during progression of hepatomas / E.A. Modjanova, A.G. Malenkov // *Experimental Cell Research*. –1973. – Vol. 76. – P. 305–314.
4. Ямскова, В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс / В.П. Ямскова // *Биофизика*. – 1978. – Т. 23. – С. 428–432.
5. Ямскова, В.П. Высокоактивные тканеспецифические адгезионные факторы печени и легкого / В.П. Ямскова, Е.А. Модянова, М.М. Резникова, А.Г. Маленков // *Молекулярная биология*. – 1977. – Т. 11, № 5. – С. 1147–1154
6. Edelman, G. Specific cell adhesion in histogenesis and morphogenesis / Edelman G. // In: *The cell in contact*. Eds.: G.M. Edelman and J. Thiery – P. A Neuroscience Institute Publication. N.-Y. John Wiley & Sons. – 1985. – Ch. 7. – P. 139–168.
7. Thiery, J. Ontogenetic expression of cell adhesion molecules: L-CAM is found in epithelia derived from the three primary germ layers / J. Thiery, A. Delouvee, W. Gallin, B. Cunningham, G. Edelman // *Dev. Biol.* – 1984. – V. 102. – P. 61–78.
8. Bissell, M. How does extracellular matrix direct gene expression? / M. Bissell, H. Hall, G. Parry // *Journal of Theoretical Biology*. – 1982. – Vol. 99. – P. 31–68.
9. Wilson, H.V. A new method by which sponges may be artificially reared / H.V. Wilson // *Science*. – 1907. – Vol. 7, № 25. – P. 912–915.
10. Moscona, A.A. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells / A.A. Moscona // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1957. – Vol. 43. – P. 184–194.

11. Moscona, A.A. Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems / A.A. Moscona // *Develop. Biol.* –1968. – Vol.18. – P. 250–277.
12. Muller, W. Two different aggregation principles in reaggregation process of dissociated sponge cell (*Geodia cydonium*) / W. Muller, I. Muller, R. Zahn // *Experientia.* – 1974. – Vol.30. – P. 899–901.
13. Jones, P.L. Regulation of gene expression and cell function by extracellular matrix / P.L. Jones, C Schmidhauser, M.J. Bissell. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 1993. – Vol. 3, №2. – P. 137–154.
14. Xu, R. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intracellular matrices / R. Xu, A. Boudreau, M.J. Bissell. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2009. – Vol. 28, №1–2 – P. 167–176.
15. Jahed, Z. Mechanotransduction pathways linking the extracellular matrix to the nucleus / Z. Jahed, H. Shams, M. Mehrbod, M.R. Mofrad // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 310. – P. 171–220.
16. Маленков, А.Г. Межклеточные контакты и реакция ткани / А.Г. Маленков, Г.А. Чуич – М.: Медицина, 1979. – 135 С.
17. Мальцева, Е.П. Роль изменения микровязкости синаптических мембран в процессе инактивации связывания лигандов с опиоидными рецепторами мембран головного мозга крыс / Е.П. Мальцева, О.С. Белоконева, С.В. Зайцев, С.Д. Варфоломеев // *Биологические мембраны.* – 1991. – Т. 8, № 8. – С. 830–834.
18. Ушаков, В.Ф. Механическая модель контакта гепатоцитов / В.Ф. Ушаков // *Биофизика.* – 1980. – Т. 2, № 3. – С. 491–493.
19. Ушаков, В.Ф. Адгезионная прочность ультраструктурных элементов контактов гепатоцитов / В.Ф. Ушаков, Ю.П. Черненко // *Биофизика.* – 1978. –Т. 23, № 3. – С. 558–559.
20. Ямскова, В.П. Сравнительное исследование действия экстрактов печени мышей линии С57В1 и СВА на адгезию гепатоцитов / В.П. Ямскова, Н.Б. Туманова, А.С. Логинов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1990. – № 3. – С. 303–306.

21. Ямскова, В.П. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию / В.П. Ямскова, М.М. Резникова // Журнал общей биологии. – 1991. – Т. 52, № 2. – С. 181–191.
22. Маленков, А.Г. Прочность межклеточных контактов и пролиферативный пул в мышечных гепатомах / А.Г. Маленков, Е.А. Модянова // Цитология. – 1968. – № 9. – С. 1087–1093.
23. Туманова, Н.Б. Влияние макромолекулярных адгезионных факторов на пролиферацию гепатоцитов в органных культурах эмбриональной печени мышей / Н.Б. Туманова, Н.В. Попова, В.П. Ямскова // Изв. Акад. наук серия биол. – 1996. – № 6. – С. 653–657.
24. Ямскова, В.П. Исследование влияния макромолекулярных адгезионных факторов, выделенных из сыворотки крови и печени млекопитающих на интенсивность синтеза белка и содержание АТФ в гепатоцитах *in vitro* / В.П. Ямскова, Н.В. Нечаева, Н.Б. Туманова, Ю.Г. Юровицкий, Т.Е. Новикова, В.И. Фатеева, И.Г. Гвазава // Изв. Акад. наук серия биол. – 1994. – № 2. С. 190–196.
25. Краснов, М.С. Действие новых регуляторных белков из растений в сверхмалых дозах / М.С. Краснов, Д.В. Маргасюк, И.А. Ямсков, В.П. Ямскова // Радиационная биология и радиоэкология. – 2003. – № 3. – С. 269–272.
26. Скрипникова, В.С. Модуляторы биологически активных регуляторных белков тканей глаза / В.С. Скрипникова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков, В.П. Ямскова // Труды научно-практической конференции «Нанотехнологии в диагностике и лечении патологии органа зрения». – М., 2008. – С. 37–39.
27. Ямскова, В.П. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка / В.П. Ямскова, В.С. Скрипникова, А.А. Молявка, А.П. Ильина, М.С. Краснов, Д.В. Маргасюк, А.В. Борисенко, Б.Б. Березин, Е.С. Кузнецова, А.К. Буряк, И.А. Ямсков // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 9. – С. 1195–1203.
28. Coman, D.R. Decreased mutual adhesiveness, a property of cell from squamous-cell carcinomas / D.R. Coman // Cancer research. – 1944. – Vol. 4. – P. 625–629.

29. Ольшевская, Л.В. Электронно-микроскопическое исследование межклеточных контактов в перевиваемых гепатомах мышей / Л.В. Ольшевская // Цитология. – 1971. – Т. 13, № 2. – С. 148–152.
30. Fentiman, J. Cultured human breast cancer cells lose selectivity in direct intercellular communication / J. Fentiman, Y. Taylor-Paradimitrou // Nature. – 1977. – Vol. 269. – P. 156–158.
31. Weinstein, R.S. The structure and function of intercellular junctions in cancer / R.S. Weinstein, F.B. Merk, J. Alroy // Advan. Cancer Res. – 1976. – Vol. 23. – P. 23–89.
32. Архипенко, В.И. Опухолевый процесс и состояние межклеточных контактов / В.И. Архипенко, Н.С. Рогова // Структура и функции межклеточных контактов. – Киев: Здоров'я. – 1982. – С. 143–155.
33. Бочарова, О.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онтогенезе у мышей инбредных линий с высокой (СВА) и низкой (С57В1) частотой спонтанных гепатом / О.А. Бочарова, Е.А. Модянова // Онтогенез. – 1982. – Т. 13, №4. – С. 427–429.
34. Маленков, А.Г. Влияние адгезионного фактора печени — контактина на механические свойства ультраструктурных элементов контакта гепатоцитов / Маленков А.Г., Модянова Е.А., Ушаков В.Ф. // Биофизика. – 1979. – Т. 24, № 6. – С. 1054–1058.
35. Модянова, Е.А. Механические свойства межклеточных контактов гепатоцитов у мышей инбредных линий и предрасположенность к спонтанным гепатомам / Е.А. Модянова, О.А. Бочарова, В.Ф. Ушаков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1980. – Т. 89, №4. – С. 459–462.
36. Модянова, Е.А. Прочность сцепления и пролиферативная активность клеток альвеол у мышей при уретановом бластомогенезе / Е.А. Модянова, Н.Н. Касаткина, О.А. Бочарова, Н.Ю. Томилина // Экспериментальная онкология. – 1982. – Т. 4, № 5. – С. 62–64.
37. Туманова, Н.Б. Нарушение молекулярных механизмов клеточной адгезии в печени мышей при генетической предрасположенности к спонтанному

бластомогенезу / Н.Б. Туманова, В.П. Ямскова // Изв. Акад. наук серия биол. – 1995. – № 3. – С. 261–265.

38. Ямскова, В.П. Новая функция альбуминов сыворотки крови / В.П. Ямскова, В.С. Скрипникова, М.С. Краснов, А.А. Молявка, Д.В. Маргасюк, А.В. Борисенко, И.А. Ямсков // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибир.: Арта. – 2008. – С. 315.

39. Борисенко, А.В. Идентификация регуляторных белков, биологически активных в сверхмалых дозах, и исследование их физико-химических свойств / А.В. Борисенко, В.П. Ямскова, И.В. Благодатских, Б.Б. Березин, М.А. Краюхина, И.А. Ямсков // Биологические мембраны. – 2007. – Т. 24, №3. – С.227–233.

40. Ямсков, И.А. Экспериментальные доказательства роли физико-химических факторов в механизме биологического действия сверхмалых доз / И.А. Ямсков, В.П. Ямскова, А.Н. Даниленко, З.С. Клеменкова, Б.Г. Антипов, Ф.Р. Черников, М.М. Гусынина, Е.Ю. Рыбакова // Российский химический журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). – 1999. – Т.43, №5. – С.34 – 39.

41. Borisenko, A.V. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses / A.V. Borisenko, V.P. Yamskova, M.S. Krasnov, I.V. Blagodatskikh, V.V. Vecherkin, I.A. Yamskov // Biochemical Physics Frontal Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers, 2007. – P. 35–45.

42. Margasyuk, D.V. Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity / D.V. Margasyuk, M.S. Krasnov, I.V. Blagodatskikh, E.N. Grigoryan, V.P. Yamskova, I.A. Yamskov // Biochemical Physics Frontal Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers, 2007. – P. 47–59.

43. Nazarova, P.A. Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions / P.A. Nazarova, V.P. Yamskova, M.S. Krasnov, A.G. Filatova, I.A. Yamskov // New Trends in Biochemical Physics Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers. – 2007. – P. 73–82.

44. Kreis, T. Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins / Eds. T. Kreis, R. Vale. – Oxford: Oxford University Press. – 1993. – P. 176.
45. Teocharis, A.D. Extracellular matrix structure / A.D. Teocharis, S.S. Scandalis, C. Gialeli, N.K. Karamanos // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 97. – P. 4–27.
46. Ямскова, В.П. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих / В.П. Ямскова, Е.Ю. Рыбакова, А.А. Виноградов, В.В. Вечеркин, И.А. Ямсков // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2004. – Т. 40, № 4. С. 407–413.
47. Gordon, J.R. Mast cells as a source of multifunctional cytokines / J.R. Gordon, P.R. Burd, S.J. Galli // *Immunology Today*, 1990. – Vol. 11, №12, P. 458–464.
48. Буеверова, Э.И. Действие адгезионного фактора сыворотки крови на пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro* / Э.И. Буеверова, Е.В. Брагина, М.М. Резникова, В.П. Ямскова, Н.Г. Хрущов // *ДАН СССР*. – 1985. – Т. 281, №1. – С. 158–160.
49. Краснов, М.С. Модель катарактогенеза позвоночных животных *in vitro* / Краснов М.С., Гурмизов Е.П., Гундорова Р.А., Ямскова В.П., Капитонов Ю.А. // *Офтальмология*. – 2005. – Т. 2, № 2. – С. 43–49.
50. Moscona, A. Rotation - mediated histogenetic aggregation of dissociated cells / A. Moscona // *Exp. Cell Res.* – 1961. – Vol. 22. – P. 455–458.
51. Moscona, A. Studies of cell aggregation: demonstration of material with selective cell-binding activity / A. Moscona // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1963. – Vol. 49. – P.743–748
52. Victorov, I.V. A new method of organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus / I.V. Victorov, A.A. Lyjin, O.P. Aleksandrova // *Brain. Res. Prot.* – 2001. – Vol. 7. – P. 30–37.
53. Григорян, Э.Н. Ротационное культивирование изолированной сетчатки тритона как способ получения малодифференцированных, пролиферирующих клеток *in vitro* / Э.Н. Григорян, М.С. Краснов, К.С. Алейникова, В.А. Поплинская, В.И. Миташов // *ДАН*. – 2005. – Т. 405, № 4. – С. 566–570.

54. Скрипникова, В.С. Биологически активный в сверхмалых дозах низкомолекулярный белок склеры / В.С. Скрипникова, М.С. Краснов, Б.Б. Березин, Т.А. Бабушкина, А.В. Борисенко, Б.А. Измайлов, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // ДАН. – 2007. – Т. 417, № 5. – С. 697–699.
55. Рыбакова, Е.Ю. Новый биорегулятор, выделенный из костной ткани крыс: физико-химические свойства, влияние на хрящевую ткань *in vitro* / Е.Ю. Рыбакова, М.С. Краснов, В.П. Ямскова, Д.В. Маргасюк, С.А. Битко, И.А. Ямсков // ДАН. – 2009. – Т. 427, № 1. – С. 136–138.
56. Рыбакова, Е.Ю. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на состояние регенератов хвостов тритонов при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* / Е.Ю. Рыбакова, М.С. Краснов, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 5, № 2. – С. 283–289.
57. Маргасюк, Д.В., Краснов М.С., Ямскова В.П., Григорян Э.Н., Ямсков И.А. Исследование регуляторного белка, выделенного из роговицы глаза быка: выделение, очистка, локализация в ткани и биологическая активность // Офтальмология. – 2005. – Т. 2, № 3. – С.81–87.
58. Назарова, П.А. Исследование регуляторных белков, выделенных из молока крупного рогатого скота: физико-химические свойства и локализация в ткани лактирующей молочной железы крысы / П.А. Назарова // – Онтогенез. – 2005. – Т. 36, № 5. – С.385–386.
59. Назарова, П.А. Изучение регуляторных белков, выделенных из тканей желез млекопитающих и их секретов (предстательная, молочная железы, молоко): физико-химические свойства и локализация в ткани / П.А. Назарова // Онтогенез. – 2006. – Т.37, №4. – С.235–236
60. Борисенко, А.В. Биологически активные в сверхмалых дозах регуляторные пептиды, выделенные из печени, сыворотки крови и желчи млекопитающих / А.В. Борисенко, И.В. Благодатских, Б.Б. Березин, М.А. Краюхина, Е.М. Липницкий, Д.С. Лычников, Е.В. Рубашникова, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сборник тезисов

IV Международного Конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». СПб. – 2006. – С.70.

61. Маргасюк, Д.В. Исследование влияния на клеточную пролиферацию в роговице глаза тритона адгезивного белка, выделенного из роговицы глаза быка / Д.В. Маргасюк, Э.Н. Григорян, В.П. Ямскова // Известия АН Серия Биологическая. – 2005. – № 6. – С.738–743.

62. Скрипникова, В.С. Активные в сверхмалых дозах биорегуляторы тканей глаза млекопитающих: автореферат дис. ... кандидата химических наук. / Скрипникова Виктория Сергеевна. – М.: РХТУ им. Менделеева, 2008. – 23 С.

63. Fabrikant, J.I. Rate of cell proliferation in the regenerating liver / J.I. Fabrikant // British Journal of Radiology. – 1968. – V. 41. – P.71–79.

64. Воронцова М.А. Тритон и аксолотль / М.А. Воронцова, Л.Д. Лиознер, И.В. Маркелова, Е.Ч. Пухельская // М.: Советская наука. – 1952. – 294 С.

65. Sichel, G. Amphibia Kupffer cells / G. Sichel, M. Scalia, C. Corsaro // Microsc. Res. Tech. – 2002. – V.57. – P.477–490.

66. Мальцев, Д. И. Тканеспецифические мембранотропные биорегуляторы, выделенные из печени и легкого млекопитающих: автореферат дис. ... канд. биол. наук. / Мальцев Дмитрий Игоревич. – М.: ФГБУН НИИ биохимической физики им. Н. М. Эмануэля. Москва, 2013. – 24 С.

67. Frangioni, G. Periodic changes in the organs involved in the erythropoiesis of anemic newts / G Frangioni, G Borgioli. // J. Exp. Zool. – 1987. –Vol. 243. – P. 409–416.

68. Ямскова, В.П. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени, сыворотки крови и желчи млекопитающих, на состояние ткани печени тритона при органотипическом культивировании / В.П. Ямскова, А.В. Борисенко, М.С. Краснов, А.П. Ильина, Е.Ю. Рыбакова, Д.И. Мальцев, И.А. Ямсков // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 3. – С. 156–164.

69. Nazarova, P.A. Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions / P.A. Nazarova, V.P. Yamskova, M.S. Krasnov, A.G. Filatova, I.A. Yamskov // New Trends in Biochemical Physics Research, Ed. by

S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, // Hauppauge NY, Nova Science Publishers, 2007. – P. 73–82.

70. Yamskova, V.P. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties / V.P. Yamskova, E.Yu. Rybakova, V.V. Vecherkin, B.B. Berezin, A.G. Filatova, I.V. Blagodatskikh, I.A. Yamskov // Biochemical Physics Frontal Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. – Hauppauge NY: Nova Science Publishers, 2007. – P. 61–70.

71. Yamskova, V.P. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing / V.P. Yamskova, M.S. Krasnov, E.Yu. Rybakova, V.V. Vecherkin, A.V. Borisenko, I.A. Yamskov // Biochemical Physics Frontal Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers, 2007. – P. 71–78

72. Константиновский, А.А. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов *in vivo* / А.А. Константиновский, М.С. Краснов, В.П. Ямскова, Е.Ю. Рыбакова, И.А. Ямсков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т.153, №2. – С.177–182.

73. Неверкович, А.С. Оценка эффективности применения препаратов адгелон и неотон при механических повреждениях суставного хряща: автореферат дис. ... к.м.н. / Неверкович Александр Сергеевич. – М.: ЦНИИ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 1998. – 22 С.

74. Гримов, Д.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Идентификация биологически активных в сверхмалых дозах регуляторных белков, выделенных из щитовидной и поджелудочной желез млекопитающих // Труды V Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы “Биохимическая физика”. – Москва. – 2005. – С. 77–83.

75. Казанский, Д.Б. Регуляция иммунитета Т-лимфоцитами: роль низкомолекулярных адгезивных гликопротеинов тимуса / Д.Б. Казанский, Т.В.

Анфалова, Л.М. Хромых, Ю.Ю. Силаева, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Онтогенез. – 2000. – Т.31, №4. – С. 276–277.

76. Куликова, О.Г. Идентификация в луке репчатом нового биорегулятора, действующего в сверхмалых дозах / О.Г. Куликова, В.П. Ямскова, А.П. Ильина, Д.В. Маргасюк, А.А. Молявка И.А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47, №4. – С. 1–5.

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

78. Куликова, О.Г., Ямскова В.П., Ильина А.П., Молявка А.А., Ямсков И.А. Изучение влияния сверхмалых доз новых растительных биорегуляторов на развитие семян растений // Труды X ежегодной международной молодежной конференции «Биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва. 8-10 ноября. 2010. С.55–57.

79. Куликова, О.Г. Биологически активные вещества белковой природы с антифунгальным и ростостимулирующим эффектами, выделенные из чеснока посевного (*Allium sativum* L.) / О.Г. Куликова, Д.И. Мальцев, М.И. Карташов, А.П. Ильина, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 5. – С. 705–713.

80. Gosling, J. P. Ed. In. «Immunoassays: a practical approach». Oxford University Press. – 2000. – P.19–36.

81. Ямсков, И.А. Изучение новой группы биорегуляторов, выделенных из подорожника большого / И.А. Ямсков, М.С. Краснов, В.П. Ямскова, О.Г. Куликова, А.П. Ильина, Д.В. Маргасюк // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47, №2. – С.146–153.

82. Куликова, О.Г. Наноразмерные биорегуляторы, выделенные из лимона, чеснока и лука / О.Г. Куликова, В.П. Ямскова, Д.В. Маргасюк, Б.Б. Березин, С.А. Битко, И.А. Ямсков // Материалы II Международной научно-практической

конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань. – 2008. – С.64–65.

83. Krasnov, M.S. Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens: Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development *in vitro* and *in vivo* / M.S. Krasnov, E.P. Gurmizov, V.P. Yamskova, I.A. Yamskov // Biochemical Physics Frontal Research, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers, 2006. – P. 21–33.

84. Jahoda, C. Hair follicle dermal sheath cells: unsung participants in wound healing / C. Jahoda, A. Reynolds // Lancet. – 2001. – V.358. – P.1445–1448.

85. Snowdon, V.K. Models and Mechanisms of Fibrosis Resolution / V.K. Snowdon, J.A. Fallowfield // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2011. – Vol. 35, №5. – P.794–799.

86. Doutremepuich, C. Paradoxical thrombotic effects of aspirin: experimental study on 1000 animals / C. Doutremepuich, O. Aguejoug, V. Desplat, F.X. Eizayaga // Cardiovascular & Hematological Disorders – Drug Targets. – 2010. V.2, № 10. – P. 103–110.

87. Яблонская, О. И. Парадоксальное влияние гидратированного C60-фуллерена в сверхнизкой концентрации на жизнеспособность и старение культивируемых клеток китайского хомячка / О.И. Яблонская, Т.С. Рындина, В.Л. Воейков, А.Н. Хохлов. // Вестник Московского университета. – 2013. – №1. – С. 14–21.

88. Пальмина, Н.П. Действие разбавленных растворов биологически активных веществ на клеточные мембраны / Н.П. Пальмина, Е.Л. Мальцева, Т.Е. Часовская // Биофизика клетки. – 2014. Т. 59, № 4. – С. 704–716.

89. Герасимов, Н.Ю. Влияние димебона на микровязкость мембран эндоплазматического ретикулума клеток мозга мышей *in vivo* / Н.Ю. Герасимов, О.В. Неврова, В.В. Каспаров, А.Л. Коварский, А.Н. Голощанов, Е.Б. Бурлакова // Биофизика клетки. – 2016. –Т. 61, № 3. – С. 478–482.

90. Коновалов, А.И. Образование наноассоциатов – фактор, определяющий физико-химические и биологические свойства высокоразбавленных водных растворов / А.И. Коновалов, Е.Л. Мальцева, И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В.

- Киселева, В.В. Каспаров, Н.П. Пальмина // Доклады академии наук. – 2014. – Т. 456, №5. – С. 561–564.
91. Рыжкина, И.С. Действие внешнего электромагнитного поля – условие образования наноассоциатов в высокоразбавленных водных растворах / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, А.И. Коновалов // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 440, № 6. – С. 778–781.
92. Першин, С.М. Корреляция оптической активности и светорассеяния высокоразбавленных водных растворов фенозана калия / С.М. Першин, А.Ф. Бункин, М.Я. Гришин, М.А. Давыдов, В.Н. Леднев, Н.П. Пальмина, А.Н. Федоров // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 461, № 2. – С. 160–163.
93. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V.227. – P. 680–685.
94. Matrix science scientific data analysis [Электронный ресурс] // URL: <http://www.matrixscience.com/>
95. ImageJ - An open platform for scientific image analysis [Электронный ресурс]// URL: <http://imagej.net>
96. Felgenhauer, В.Е. Internal Anatomy of the Decapoda: An Overview // Microscopic Anatomy of Invertebrates. Volume 10: Decapod Crustacea / ed. Harrison F.W. and Humes A. G. – P. 45–75. Wiley-Liss, Inc. 1992
97. Gibson, R. The decapod hepatopancreas / R. Gibson, P. L. Barker. // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. – 1979. – Vol.77. – P.285–346.
98. Correa Jr., J.D. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules / J. D. Correa Jr., M. Farina, S. Allodi // Tissue & Cell. – 2002. – Vol.34, №5. – P.315–325.
99. Davis, L.E A study of growth and cell differentiation in the hepatopancreas of the crayfish / Lowell E. Davis, Allison L. Burnett // Developmental Biology –1964. – Vol. 10, №1. P.122–153.
100. Barker, P.L. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda:

Nephropidae) / P.L. Barker, R. Gibson // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1977. – V.26. – P.297–394.

101. Loizzi, R.F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural anatomy of epithelial cell lines and muscle networks. // Zelforsch. Mikrosk. Anat. – 1971. –Vol. 77. – P.420-440.

102. Hopkin, S.P. Some observation on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) / S.P Hopkin, J.A Nott. // J. Mar. Biol. Assoc. – 1979. –Vol.59. – P.867–877

103. Богданов, В.В. Биологически активные пептиды гепатопанкреаса камчатского краба / В.В. Богданов, Б.Б. Березин, А.П. Ильина и др. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51, № 4. — С. 434–440.

104. Ильина, А.П. Исследование структуры биорегулятора, выделенного из головного мозга крыс / А.П. Ильина, А.А. Молявка, В.П. Ямскова, А.К. Буряк, И.А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т.50, № 4. – С.442–448

105. Zhang, RQ Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by zinc ions: a new type of complexing inhibition. / RQ Zhang, QX Chen, R Xiao, LP Xie, XG Zeng, HM Zhou. // Bioch Biophys Acta. – 2001. – Vol. 1545, №1–2. – P.6–12.

106. Kim, E. Reaction Mechanism of Alkaline Phosphatase Based on Crystal Structures Two-metal Ion Catalysis / E. Kim, H.W. Wyckoff // J. Mol. Biol. –1991. –Vol. 218. –P. 449–464

107. Alvarez, C. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain Ag1, Isolated from the Midgut of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* / C. Alvarez, P. Kukutla, J. Jiang, W. Yu, J. Xu // Journal of Bacteriology. –2012. –V. 194, №19. –P. 5449

108. Ямсков, И.А. Низкомолекулярный гликопротеин из сыворотки крови крупного рогатого скота: структура и свойства / И.А. Ямсков, А.А. Виноградов, А.Н. Даниленко, Л.А. Маслова, Е.Ю. Рыбакова, В.П. Ямскова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37, №1. – С. 36–42.

109. Ямсков, И.А. Растительные регуляторные белки, активные в сверхмалых дозах / И.А. Ямсков, Д.В. Маргасюк, О.Г. Куликова, Б.Б. Березин, С.А. Битко, В.П.

- Ямскова // Труды VII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика». – Москва. – 2007. – С.289–293.
110. Guus, R., On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves / R. Guus, I. L. G. Newton // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – V. 94, №1. – P. 1–10.
111. Зюганов, В. В. Взаимоотношения паразит-хозяин у глохидиев европейской жемчужницы *Margaritifera margaritifera* (*Margaritiferidae: Bivalvia*) и массовых видов рыб европейского севера СССР / В.В. Зюганов, Л.П. Незлин, А.А. Зотин, А.С. Розанов // *Паразитология.* – 1990. – Т.24, №4. – С. 315–321.
112. Флора и фауна Белого моря: иллюстрированный атлас / под ред. А.Б. Цетлина, А.Э. Жадан, Н.Н. Марфенина. — М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. – 471 с.: 1580 илл.
113. Lane, D. J. W. Byssus drifting and the drifting threads of the young post-larval mussel *Mytilus edulis*. / D. J. W. Lane, A. R. Beaumont, J. R. Hunter // *Marine Biology.* – 1985. – Vol. 84, №3. – P. 301–308.
114. Махров, А.А., Болотов И.Н. Влияет ли европейская жемчужница (*Margaritifera Margaritifera*) на жизненный цикл атлантического лосося (*Salmo Salar*)? / А.А. Махров, И.Н. Болотов // *Успехи геронтологии.* – 2010. –Т.23, №3. – С. 375–382.
115. Попов, И.Ю. Различия в продолжительности жизни пресноводных жемчужниц (*Margaritifera Margaritifera*) как свидетельство невозможности «пренебрежимого старения» / И.Ю. Попов, А.Н. Островский // *Успехи геронтологии.* – 2010. – Т. 23, № 3. – С. 371–375.
116. Sturm, Á. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration / Á. Sturm, Z. Ivics, T. Vellai // *Cell Mol. Life Sci.* – 2015. – Vol. 72, №10. – P.1839–1847.
117. Skinner, A. Ecology of the Freshwater Pearl Mussel. Conserving Natura 2000 Rivers. Ecology Series / Skinner, A., Young, M., Hastie, L. // *English Nature, Peterborough.* – 2003. – №2.

118. Зюганов, В.В. Арктические долгоживущие и южные короткоживущие моллюски жемчужницы как модель для изучения основ долголетия / В.В. Зюганов // Успехи геронтологии. – 2004. – № 14. – С. 21–31.
119. Степанова, М.Б. Род Фузарий (*Fusarium*) // Мир растений: в 7 томах. – М.: Просвещение, 1991. – С. 395–398.
120. Патент 1781882 СССР, МПК: А61К 35/66 Способ получения препарата для лечения язвенной болезни желудка / Брагинцева Л. М, Устынюк Т. К, Коваленко В. А; Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова. – 4821655/13, заявл. 06.04.1990 1-й ; опубл. 10.11.1998.
121. Беккер, З. Э. Физиология и биохимия грибов / З. Э. Беккер. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. – 230 с.
122. 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.
123. Micsonai, A. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy / A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. –Vol.16, № 24. – P. 3095–3103.
124. Карапетян, А.Ф. Способность к регенерации печени у лягушки озерной (*Rana ridibunda*) после частичной гепатэктомии / А.Ф. Карапетян, К.А. Дживанян // Цитология. – 2006. – Т.48, №4. – С. 346–354.
125. Логинов, А.С. Исследование адгезии гепатоцитов при хронических диффузных заболеваниях печени / А.С. Логинов, В.П. Ямскова, Н.Б. Туманова, В.Д. Ткачев, В.И. Решетняк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1989. – №.8. – С.160–162.
126. Мальцев, Д. И. Биорегулятор из ткани печени крыс / Д. И. Мальцев, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т.52, №3. – С. 1–4.

127. Gutierrez-Ruiz, M.C. Liver fibrosis: searching for cell model answers / M.C. Gutierrez-Ruiz, L.E. Gomez-Quiroz // *Liver International*. – 2007. – P. 434–439
128. Weiler-Normann, C. Mouse Models of Liver Fibrosis / C. Weiler-Normann, J. Herkel, A.W. Lohse. // *Gastroenterology*. – 2007. – Vol.45 – P. 43–50
129. Iredale, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ / J.P. Iredale // *Journal of Clinical Investigation*. – 2007. – Vol.117. – P. 539–548
130. Zhou, W.C. Pathogenesis of liver cirrhosis. / W.C Zhou. Q.B. Zhang, L. Qiao // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20, №23. – P. 7312–7324
131. Sharma, U. Alkaline Phosphatase: An Overview / U. Sharma, D. Pal, R. Prasad // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. – 2014. – Vol. 29., №3. – P. 269–278
132. Constandinou, C. Fibrosis Research Methods and Protocols Modeling Liver Fibrosis in Rodents / C. Constandinou, N. Henderson, J.P. Iredale // *Methods of Molecular Medicine*. – 2005. – Vol. 117. – P. 237–250.
133. Lozano-Sepulveda, S.A. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells / S.A. Lozano-Sepulveda, O.L. Bryan-Marrugo, C. Cordova-Fletes, M.C. Gutierrez-Ruiz, A.M. Rivas-Estilla // *World J. Hepatol*. – 2015. – Vol. 7, I. 29. – P. 2880–2889.
134. 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 Пущинской школы-конференции «Биология XXI века». – Пущино. –2016. – С. 7.
135. Богданов, В.В. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени крыс, гепатопанкреаса краба и гриба *Fusarium sambucinum* на развитие экспериментального фиброза у 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». С.-Пб. – 2016. – С. 51–56.

136. Pinchuk, I., Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays /I. Pinchuk, H. Shoval, Y. Dotan, D. Lichtenberg // Chem. Phys. Lipids. – 2012. – Vol.165, №6 – P. 638–647.
137. Кучерявый, Ю.А. Гепатопротекторы: рациональные аспекты применения: учебное пособие для врачей / Ю.А. Кучерявый, С.В. Морозов. –М.: Форте Принт. – 2012. – 36 С.
138. Rahmat, A.A. Protection of CCl₄-Induced Liver and Kidney Damage by Phenolic Compounds in Leaf Extracts of *Cnestis ferruginea (de Candolle)* / A.A Rahmat, F.D. Ahsana, I.M. Choudhary // Pharm. Res. – 2014. – Vol. 6, №1. – P. 19–28.
139. Шайхалиев, А.И. Действие новых композиций на восстановление костных дефектов у крыс в эксперименте / А.И. Шайхалиев, Г.М. Стречкий, М.С. Краснов, Е.Ю. Рыбакова, В.Е. Тихонов, В.П. Ямскова, И.А. Ямсков // Фундаментальные исследования. – 2013. – №9., Ч.2. – С. 271–276.
140. Колокольчикова, Е.Г. Морфофункциональная оценка влияния биологической повязки на основе коллагена 1-го типа на регенерацию кожи после ожоговой травмы / Е.Г. Колокольчикова, Е.А. Жиркова, П.К. Головатенко-Абрамов, Е.С. Платонов, В.С. Бочарова, В.Б. Хватов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – №1. – С. 47–54.
141. Ross, P. Extraordinary Animals: An Encyclopedia of Curious and Unusual Animals. /P. Ross // Greenwood Press, 2007. – P. 224–225.