

В.П. ЯМСКОВА¹, М.С. КРАСНОВ¹,
В.С. СКРИПНИКОВА², А.А. МОЛЯВКА²,
А.П. ИЛЬИНА², Д.В. МАРГАСЮК², А.В. БОРИСЕНКО²,
Б.Б. БЕРЕЗИН², И.А. ЯМСКОВ²

¹ Учреждение Российской академии наук «Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова», Москва,
E-mail: embrmsk@mail.ru

² Учреждение Российской академии наук
«Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова», Москва

МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ В МИКРОДОЗАХ



Из тканей витреоретинальной области глаза были выделены новые, ранее не изученные биорегуляторы, которые активны в сверхмалых дозах, соответствующих 10^{-8} – 10^{-17} мг белка/мл. Установлено, что в состав указанных биорегуляторов входят регуляторные пептиды, модуляторы, представленные белками с молекулярными массами 15–70 кДа, одним из которых является альбумин сыворотки крови. Установлена связь между наноразмерным состоянием биорегуляторов и их способностью проявлять активность в сверхмалых дозах.

© В.П. ЯМСКОВА, М.С. КРАСНОВ, В.С. СКРИПНИКОВА,
А.А. МОЛЯВКА, А.П. ИЛЬИНА, Д.В. МАРГАСЮК,
А.В. БОРИСЕНКО, Б.Б. БЕРЕЗИН, И.А. ЯМСКОВ, 2009

Введение. В различных тканях млекопитающих нами обнаружены новые биорегуляторы, которые в сверхмалых дозах (СМД) оказывают влияние на основные биологические процессы (адгезия, миграция, дифференцировка клеток), способствуют поддержанию гистоструктуры ткани при культивировании *in vitro*, увеличивая жизнеспособность клеток [1–8]. Согласно полученным данным упомянутые биорегуляторы характеризуются как сложно-компонентная наноразмерная система: в их состав входят низкомолекулярные белки, липиды, углеводы. Высказано предположение о том, что биологически активной компонентой этой сложной системы являются низкомолекулярные белки, которые получили название регуляторных (РБ). Установлено, что РБ в тканях взаимодействуют с другими белками, модулирующими их активность [2, 9]. Один из таких белков-модуляторов обнаружен в сыворотке крови и идентифицирован как представитель мультисемейства альбуминов [9]. Показано также, что белок-модулятор обратимо инактивирует РБ сыворотки крови, и в основе этого процесса лежит взаимодействие РБ и белка-модулятора по механизму «лектин-углеводного» узнавания.

Несмотря на значительный экспериментальный материал, полученный при исследовании биологической активности и изучении физико-химических свойств биорегуляторов упомянутой группы, механизм их действия остается не до конца выясненным [10]. В этом аспекте важнейшим представляется вопрос о составе биорегуляторов и идентификации в них биологически активной компоненты. В настоящем исследовании предпринята попытка ответить на этот вопрос. Одним из важнейших этапов настоящего исследования является изучение специфической активности биорегуляторов. Поскольку разработанная нами экспериментальная модель органотипического культивирования сетчатки и пигментного эпителия (ПЭ) в составе заднего отдела глаза тритона *Pi. waltl* является наиболее показательной для изучения специфической активности указанных биорегуляторов – влияния на клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку, в качестве основного объекта исследования нами выбран биорегулятор ПЭ [11]. Ранее было установлено, что биологическое действие биорегуляторов исследуемой

группы, в том числе и биорегулятора ПЭ, характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности [1, 4–8, 11].

Материалы и методы. Биорегуляторы, в том числе и биорегулятор ПЭ, выделяли из соответствующих тканей по разработанной ранее методике [2, 4–11]. Ткани глаза – радужку, стекловидное тело, цилиарное тело, нейральную сетчатку, пигментный эпителий – выделяли хирургически из свежезнуклеированных глаз молодых бычков и отдельно экстрагировали в растворе, содержащем 1 мМ CaCl₂, 0,15 М NaCl, 1 мМ NERES, при 4–6 °С в течение 2,5–3,0 ч [4]. К тканевым экстрактам добавляли серноокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли, а также ЭДТА для создания концентрации 10⁻² моль/л. После центрифугирования при 105 000 об/мин (30 мин) собирали три фракции: флотирующую фракцию, супернатант и осадок. Серноокислый аммоний и ЭДТА удаляли из фракций длительным диализом против дистиллированной воды и определяли мембранотропную активность методом биотестирования.

Обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на хроматографе Agilent 1100 Series (США), колонка Биохиммак С8–200 (4,6 мм × 150 мм), градиент вода (0,1 % ТФА) – ацетонитрил, скорость элюции 0,5 мл/мин, детекция при 210 и 280 нм.

Рехроматографию первой фракции ПЭ, полученной после обращенно-фазовой ВЭЖХ, осуществляли на колонке С18 (2 × 150 мм, 100 Å) Luna («Phenomenex», США), предварительно уравновешенной в стартовом буфере (0,1 % трифторуксусная кислота). Хроматографию проводили при скорости 0,3 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила 0→30 % за 70 мин. Выход фракций определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению при длине волн 210 и 280 нм. Полученную фракцию собирали, лиофилизовали, после чего проводили масс-спектрометрический анализ.

Для ВЭЖХ белковых фракций, элюированных из геля после электрофореза флотирующей фракции ПЭ, применяли колонку (2 × 150 мм, 300 Å) высокого давления для обращенно-фазовой хроматографии серии Jupiter С5 («Phenomenex», США), предварительно уравновешен-

ную в стартовом буфере (0,1%-ная трифторуксусная кислота). Хроматографию проводили при скорости 0,3 мл/мин в градиенте концентрации ацетонитрила. Для оптимального по скорости и разрешению разделения компонентов использовали линейный градиент ацетонитрила: 0→70 % за 70 мин. Выход фракций определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению при длине волн 210 и 280 нм. Полученные фракции собирали, лиофилизовали, после чего проводили масс-спектрометрический анализ.

Гидродинамический радиус частиц биорегуляторов в водном растворе определяли на приборе «PhotoCor Complex» («ФотоКор», Россия), снабженном автоматическим гониометром, псевдокорреляционной системой счета фотонов PhotoCor-PC2 (характеризуется отсутствием послеимпульсов, что позволяет измерять размеры наночастиц порядка 1 нм и выше), одноплатным мультитременным коррелятором реального времени «PhotoCor-FC», использованным в логарифмической конфигурации (интервал времен ожидания 0,01–5·10² мс) и гелий-неоновым лазером Uniphase 1135Р мощностью 20 мВт с длиной волны 633 мкм. Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 40–130° при 23 °С. Растворы, содержащие РБ, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны «Durapore» с диаметром пор 0,45 мкм («Millipore»). Метод основан на оценке времени флуктуации интенсивности рассеянного света, что позволяет рассчитать коэффициент диффузии и радиус наночастиц [12].

Размеры присутствующих в растворах частиц определяли с использованием сканирующего зондового микроскопа «ФемтоСкан» (Россия). Растворы, содержащие РБ, предварительно пропускали через фильтры Durapore с диаметром пор 0,45 мкм и наносили на поверхность свежего скола слюды, размещенного на поверхности магнитного носителя. Затем поверхность высушивали при комнатной температуре. Для регистрации данных использовали однолеверные кантилеверы категории Standart ФемтоСкан с жесткостью 0,03 Н/м. Данные обрабатывали при помощи встроенной программы обсчета FemtoScan Online (<http://www.nanoscopy.net>) [13]. Приведенные

изображения получены при сканировании в контактном режиме.

Методом масс-спектрометрии были исследованы фракции ПЭ, полученные после обращенно-фазовой ВЭЖХ. Образцы концентрацией 10 пмоль/мкл упаривали досуха с последующим разведением в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. В работе использовали следующие матрицы: DHB – 2,5-дигидроксibenзойная кислота, синапиновая кислота, α -циано-4-цианомовая кислота.

Анализ молекулярной массы белков проводили методом MALDI TOF на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex 2 MALDI («Bruker», Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора.

Электрофорез в ПААГ осуществляли по методу Лэммли [14].

Western-блоттинг проводили в системе Bio-Rad, используя перенос белков в буфере на PVDF мембрану и проявление с помощью ECL-kit.

Для идентификации биорегуляторов во фракциях использовали адгезиометрический метод, основу которого составляет определение мембранотропной активности [1, 2].

Специфическую активность биорегулятора ПЭ, а также отдельных его компонентов изучали на экспериментальной модели органотипического культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. walhi* [4, 11]. Исследуемые препараты биорегулятора добавляли в питательную среду в начале культивирования.

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения экстрактов из тканей заднего отдела глаза применяли стандартную методику экстрагирования, специально разработанную для биорегуляторов изучаемой группы [1, 2, 4–8]. Биологическое тестирование тканевых экстрактов показало проявление ими в СМД мембранотропного действия, которое характеризовалось отсутствием тканевой специфичности. Эти данные принципиально отличались от результатов исследования экстрактов, выделенных из других тканей млекопитающих, таких как легкое, печень, сыворотка крови и др. [1, 2, 4–8]. Например, экстракты печени крыс проявляли мембранотропную активность толь-

ко в отношении клеток печени, экстракты легкого крыс – только в отношении клеток легкого [1], а сыворотка крови не проявляла мембранотропного действия ни в отношении клеток печени, ни в отношении клеток легкого [2]. Полученные данные показывают, что состояние биорегуляторов в экстрактах тканей заднего отдела глаза иное, чем в экстрактах, выделенных из других тканей.

Согласно ранее разработанной методике очистки биорегуляторов упомянутой группы следующим этапом является фракционирование тканевых экстрактов методом высаливания белков в присутствии сернокислого аммония [2, 4–8]. Как правило, исследуемые биорегуляторы находятся в растворенном состоянии в насыщенном растворе сернокислого аммония, а примесные белки переходят в осадок. Однако в случае экстрактов тканей заднего отдела глаза было показано иное распределение биологической активности во фракциях, образовавшихся в процессе высаливания: фракции супернатантов не обладали мембранотропным действием, его проявляли в СМД фракции осадков. После повторного высаливания распределение мембранотропной активности во вновь образовавшихся фракциях осадков и супернатантов осталось прежним. Эти данные также указывают на иное состояние биорегуляторов в тканях заднего отдела глаза, чем в других тканях млекопитающих.

После высаливания тканевых экстрактов тканей заднего отдела глаза сернокислым аммонием в присутствии ЭДТА (10^{-2} М) получены три фракции: флотирующая при 105 000 g, супернатант и осадок.

Методом биотестирования было показано, что флотирующая при 105 000 g фракция и супернатант проявляли мембранотропную активность в СМД, следовательно, содержали биорегуляторы изучаемой группы. Фракция осадка была не активна, и ее далее не исследовали.

Таким образом, результаты исследования экстрактов тканей заднего отдела глаза показывают, что присутствующие в них биорегуляторы связаны с белками, причем в этом взаимодействии участвуют ионы Ca^{2+} . Эти данные согласуются с ранее полученными, которые показали важную роль ионов Ca^{2+} в функционировании исследуемых биорегуляторов [4, 15].

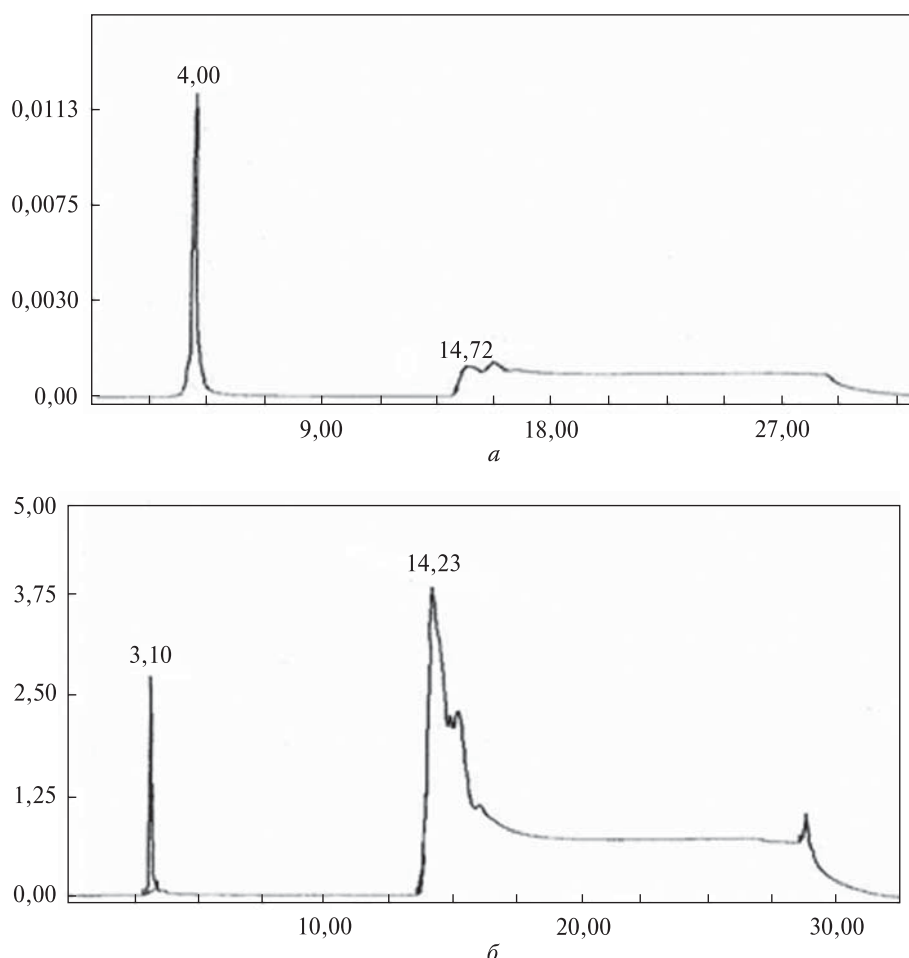


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ фракций супернатанта (а) и флотирующей при 105 000 g фракции (б), выделенных из пигментного эпителия: по вертикали – оптическая плотность при длине волны 280 нм; по горизонтали – время удерживания, мин

При обращенно-фазовой ВЭЖХ биологически активных в СМД фракций (флотирующей при 105 000 g фракции и супернатанта), выделенных из тканей заднего отдела глаза, наблюдали одинаковую картину разделения. Во всех случаях были идентифицированы две фракции – первая, время удерживания которой соответствовало 3–5 мин, и вторая со временем удерживания 14–17 мин. В качестве примера на рис. 1 представлена картина разделения обращенно-фазовой ВЭЖХ фракции супернатанта и флотирующей при 105 000 g фракции, выделенных из ПЭ. Следует отметить, что аналогичная картина разделения в соответствующих условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ была получена для фракций биорегуля-

торов изучаемой группы, выделенных из экстрактов других тканей млекопитающих [8, 16].

Методом биотестирования было показано, что активность проявляют только фракции, характеризующиеся временем удерживания 3–5 мин, и только в концентрациях, соответствующих 10^{-5} – 10^{-6} мг/мл. Эти данные продемонстрировали изменение биологически активной фракции, которое произошло в процессе обращенно-фазовой ВЭЖХ. Исчезла ее способность проявлять активность в СМД и полимодальная дозовая зависимость, а интервал концентраций, в котором упомянутая фракция проявляет мембранотропное действие, относится к области лигандо-рецепторного взаимодействия (рис. 2). Можно предположить,

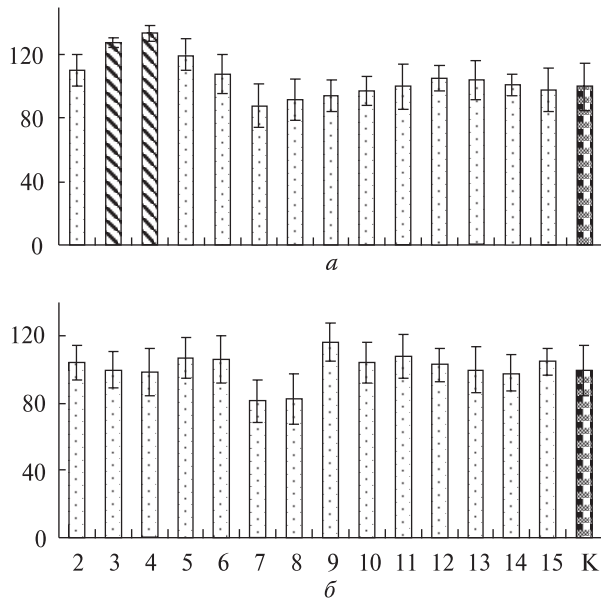


Рис. 2. Мембранотропная активность ВЭЖХ-фракций со временем удерживания 3,57 мин (а) и 14,42 мин (б), выделенных из тканевого экстракта радужки, *in vitro*: по горизонтали — степень десятикратного разбавления белковой фракции (исходная концентрация 0,045 мг/мл (а), 0,028 мг/мл (б)); по вертикали — величина мембранотропного эффекта, Ма, %; К — контроль; столбцы — воздействие фракции в разбавлении 10^x , где x — показатель степени десятикратного разбавления изучаемого препарата. Штриховкой отмечены столбцы, соответствующие разведениям фракций, где обнаружена мембранотропная активность

что изменение характера активности связано с диссоциацией биорегулятора, выражающейся в отщеплении группы белков в виде отдельной фракции со временем удерживания 14–17 мин.

Методом электрофореза в ПААГ было показано, что во фракции, флотирующей при 105 000 g, и в супернатанте присутствуют высокомолекулярные белки, характеризующиеся значением «кажущейся» молекулярной массы 60–70 кДа (рис. 3).

В настоящем исследовании предпринята попытка изучить способность ВЭЖХ-фракции со временем удерживания 14–17 мин модулировать биологическую активность фракции со временем удерживания 3–5 мин, для чего был исследован биорегулятор ПЭ.

ПЭ, контактирующий с сетчаткой, а также с сосудистой оболочкой, имеет большое значение для проведения зрительного акта. ПЭ пред-

ставляет собой монослой крупных клеток с достаточно равномерным распределением пигмента меланина в их цитоплазме. При отслойке сетчатки у низших позвоночных происходит изменение статуса клеточной дифференцировки клеток ПЭ, что приводит к нарушению распределения пигмента — он смещается на апикальную сторону с последующим выходом в межклеточное пространство. Происходит нарушение адгезии в пределах монослоя, миграция и пролиферация депигментированных клеток в образующуюся полость глаза.

Изучали две фракции, которые получены после обращенно-фазовой ВЭЖХ супернатанта, выделенного из тканевого экстракта ПЭ. Исследование физико-химических свойств этих фракций проводили с помощью методов кругового дихроизма (КД), динамического лазерного светорассеяния, атомно-силовой микроскопии (АСМ). Ранее для биорегуляторов данной группы было показано, что они обладают своеобразными физико-химическими свойствами: их КД-спектры отражают своеобразие структуры белков, входящих в состав биорегуляторов. В водных растворах даже при низких концентрациях они образуют крупные наноразмерные частицы [5, 7].

КД-спектр первой ВЭЖХ-фракции, выделенной из тканевого экстракта ПЭ, не характерен для классических белков, например таких, как альбумин сыворотки крови, в то время как КД-спектр второй ВЭЖХ-фракции соответствует классическим белкам.

Вторичная структура первой ВЭЖХ-фракции представлена, в основном, β -структурами и статистическим клубком: α -спираль — 7,6 %; β -структуры антипараллельные — 37,4 %; β -структуры параллельные — 5,7 %; β -складки — 18,9 %; статистический клубок — 30,4 %. Вторичная структура гидрофобной ВЭЖХ-фракции преимущественно содержит α -спирали (48,2 %), а также статистический клубок (25,7 %), β -структуры антипараллельные (4,4 %); β -структуры параллельные (6,1 %); β -складки (15,6 %) [4–8, 16].

Обращает на себя внимание, что время удерживания бычьего сывороточного альбумина (БСА), который использован в качестве стандарта при обращенно-фазовой ВЭЖХ, соответствовало времени удерживания гидрофоб-

ной ВЭЖХ-фракции. Мы предположили, что в состав этой фракции входит альбумин сыворотки крови. Методом иммуноблотта с поликлональной антисывороткой против БСА определили, что в указанной фракции присутствует БСА.

Эти данные подтверждены результатами, полученными методом масс-спектрометрии, которые приведены далее.

С помощью методов динамического лазерного светорассеяния и АСМ установили, что в растворах обеих ВЭЖХ-фракций, выделенных из тканевого экстракта ПЭ, наночастицы отсутствуют. Следует отметить, что до разделения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ во фракциях супернатанта и флотирующей при 105 000 g фракции были обнаружены наночастицы.

На рис. 4 представлена кривая распределения частиц, присутствующих в водном растворе супернатанта, который выделен из тканевого экстракта ПЭ, по кажущейся величине гидродинамического радиуса при угле рассеяния 90°. Наиболее количественно представлены частицы размером $189,25 \pm 9,45$ нм. Графическое экстраполирование усредненных данных позволило оценить размеры частиц при величине угла рассеяния 0°. Усредненное зна-

чение гидродинамического радиуса для частиц составило $R_h = 205,50 \pm 11,30$ нм.

При исследовании АСМ методом супернатанта, выделенного из тканевого экстракта ПЭ, обсчет экспериментальных данных показал, что размеры частиц варьируют в широком диапазоне — 100–200 нм (рис. 5). При этом необходимо отметить, что при столь большой величине радиуса они имеют небольшую высоту профиля — 5–10 нм.

Исследование методом динамического лазерного светорассеяния раствора флотирующей при 105 000 g фракции, выделенной из тканевого экстракта ПЭ, показало, что в нем присутствуют частицы размером $130,00 \pm 6,50$ нм. Графическое экстраполирование усредненных данных позволило оценить размеры частиц при величине угла рассеяния 0°. Это значение составило $R_h = 172,50 \pm 9,25$ нм. Полученные результаты были подтверждены методом АСМ (рис. 5).

Таким образом, исследование размеров частиц во фракциях, выделенных из тканевого экстракта ПЭ, которые получали на отдельных стадиях очистки, показало, что наноразмерные частицы отсутствуют в ВЭЖХ-фракциях. Полученные данные представляются исключительно важными, поскольку после обращенно-фазовой ВЭЖХ происходит изменение активности

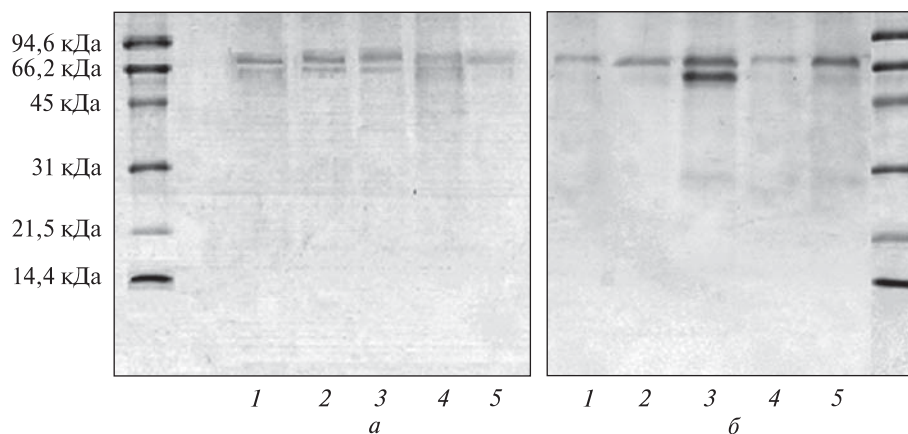


Рис. 3. Электрофорез в 15 % ПААГ с добавлением ДДС-На фракций биорегуляторов, выделенных из тканей заднего отдела глаза: *a* — фракции супернатантов, полученные после высаливания в присутствии ЭДТА тканевых экстрактов радужки (1), стекловидного тела (2), сетчатки (3), пигментного эпителия (4), цилиарного тела (5); *б* — флотирующие при 105 000 g фракции, полученные после высаливания в присутствии ЭДТА тканевых экстрактов радужки (1), цилиарного тела (2), пигментного эпителия (3), сетчатки (4), стекловидного тела (5). В качестве маркеров использовали α -лактальбумин — 14,4 кДа, соевый ингибитор трипсина — 20,1 кДа, угольную ангидразу — 30 кДа, овальбумин — 43 кДа, бычий сывороточный альбумин — 67 кД и фосфоорилазу b — 94 кДа («Helicon», Россия)

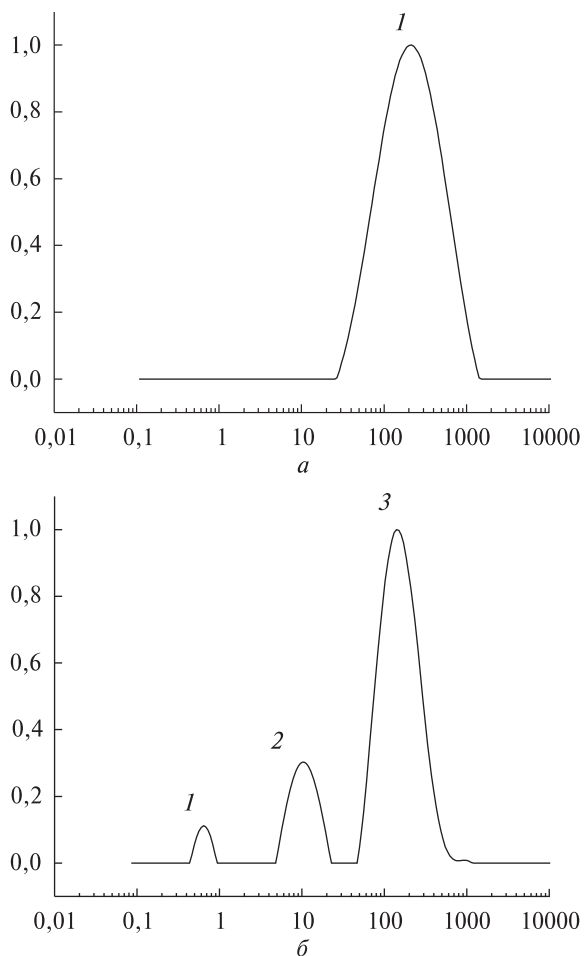


Рис. 4. Распределение частиц, присутствующих в водном растворе супернатанта (*a*) и флотирующей фракции (*б*), выделенных из тканевого экстракта пигментного эпителия: по горизонтали – гидродинамический радиус R_h (логарифмическая шкала); по вертикали – функция распределения частиц; *a* – пик 1: $189 \pm 9,45$ нм; *б* – пик 1: $0,65 \pm 0,03$ нм 3 %; пик 2: $10,40 \pm 0,51$ нм 17 %; пик 3: $130,00 \pm 6,50$ нм 80 %

биорегулятора: ВЭЖХ-фракция с временем удерживания 3,10 мин была активна в концентрациях, соответствующих лигандо-рецепторному механизму, т.е. на этой стадии разделения биорегулятора исчезла его способность проявлять биологическое действие в СМД. Это позволяет сделать вывод о том, что существует связь между наноразмерным состоянием биорегуляторов упомянутой группы и их активностью в СМД.

ВЭЖХ-фракцию со временем удерживания 3,10 мин, выделенную из тканевого экстракта

ПЭ, рехроматографировали на колонке С18 (рис. 6) и получили ВЭЖХ-фракцию со временем удерживания 59,8 мин, которую далее исследовали методом MALDI TOF масс-спектрометрии (рис. 7).

Идентифицированный сигнал соответствует пептиду со значением молекулярной массы 4372 Да. Следует отметить, что других сигналов, равнозначных по интенсивности, не обнаружили. Эти данные указывают на высокую степень очистки фракции, полученной в результате повторной обращенно-фазовой ВЭЖХ, и на присутствие в ней низкомолекулярного пептида указанной массы. Это позволяет предположить, что компонентой биорегулятора ПЭ, ответственной за его биологическую активность, является обнаруженный низкомолекулярный пептид, который получил название регуляторного пептида (РП).

Дальнейшее исследование было посвящено выявлению способности ВЭЖХ-фракции со временем удерживания 14,23 мин, выделенной из тканевого экстракта ПЭ, модулировать активность РП. Для этого предприняли попытку восстановить комплекс РП – модулятор и изучить его активность. Восстановление комплекса РП – модулятор осуществляли в присутствии ионов Ca^{2+} [9]. Методом биотестирования установили, что образовавшийся комплекс проявлял мембранотропную активность. В отличие от очищенного, комплекс РП – модулятор проявлял мембранотропную активность в разведениях 10^{10} , 10^{14} – 10^{15} от исходной концентрации раствора, т.е. в СМД. Аналогичные результаты получили и для других исследуемых в настоящей работе биорегуляторов, выделенных из тканей заднего отдела глаза. На рис. 8 в качестве примера представлены данные, полученные при исследовании мембранотропной активности комплекса РП – модулятор, выделенного из тканевого экстракта радужки. Важным результатом является обнаружение в водном растворе комплекса наночастиц размером 100–200 нм.

Таким образом, было установлено, что РП и комплекс РП – модулятор, выделенные из экстрактов тканей заднего отдела глаза, различаются по характеру мембранотропного действия. Полученные данные свидетельствуют о способности ВЭЖХ-фракции (время

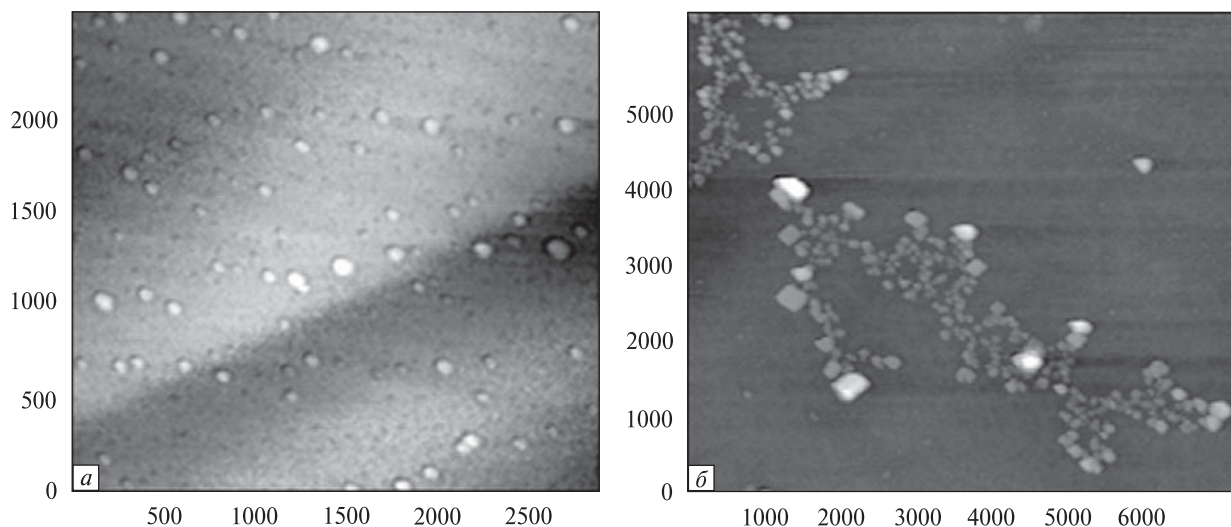


Рис. 5. Наночастицы, обнаруженные во фракциях супернатанта (а) и флотирующей фракции (б), выделенных из тканевого экстракта пигментного эпителия, на поверхности скола слюды (сканирование в контактной моде) согласно данным атомно-силовой микроскопии. По осям – линейные размеры частиц, нм

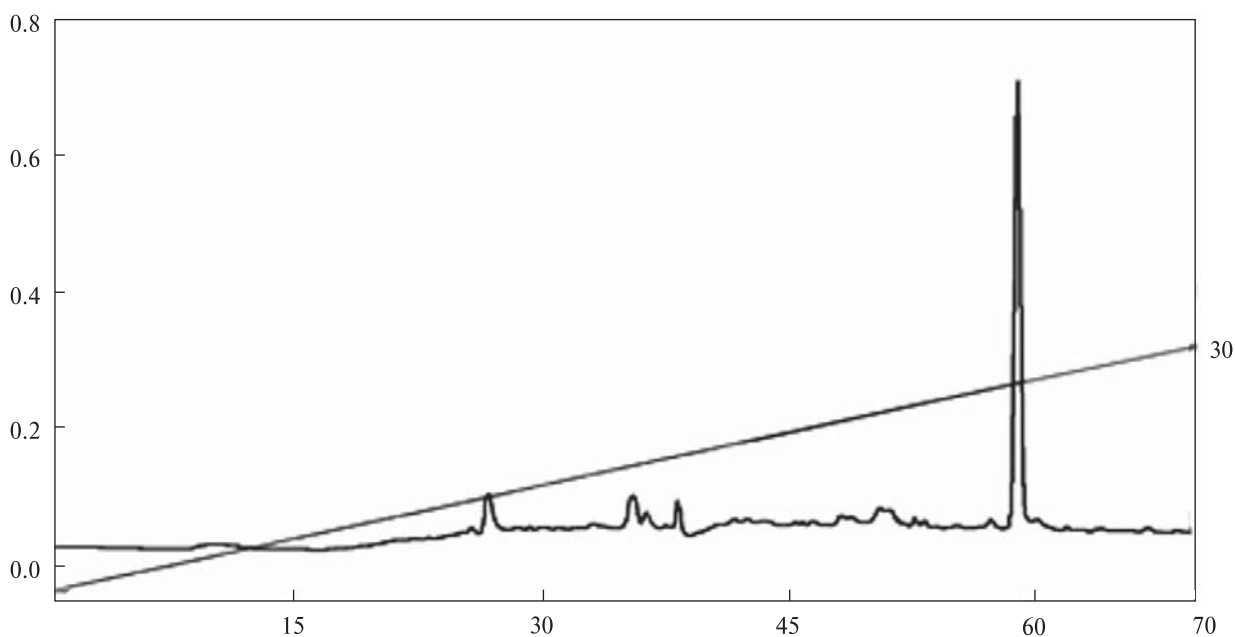


Рис. 6. Рехроматография ВЭЖХ-фракции со временем удерживания 3,10 мин, выделенной из тканевого экстракта пигментного эпителия, на колонке С18: по горизонтали – время элюции, мин; по вертикали слева – оптическая плотность при длине волны 280 нм; справа – процент CH_3CN – градиент ацетонитрила

удерживания 14–17 мин) изменять характер биологической активности РП. Эти данные указывают на то, что белки, входящие в состав указанной ВЭЖХ-фракции, ответственны за действие биорегуляторов в СМД. Фрак-

ция получила название – «модулятор активности РП».

Для идентификации белков, входящих в состав модулятора методом электрофореза в ПААГ, были получены фракции с молекулярной мас-

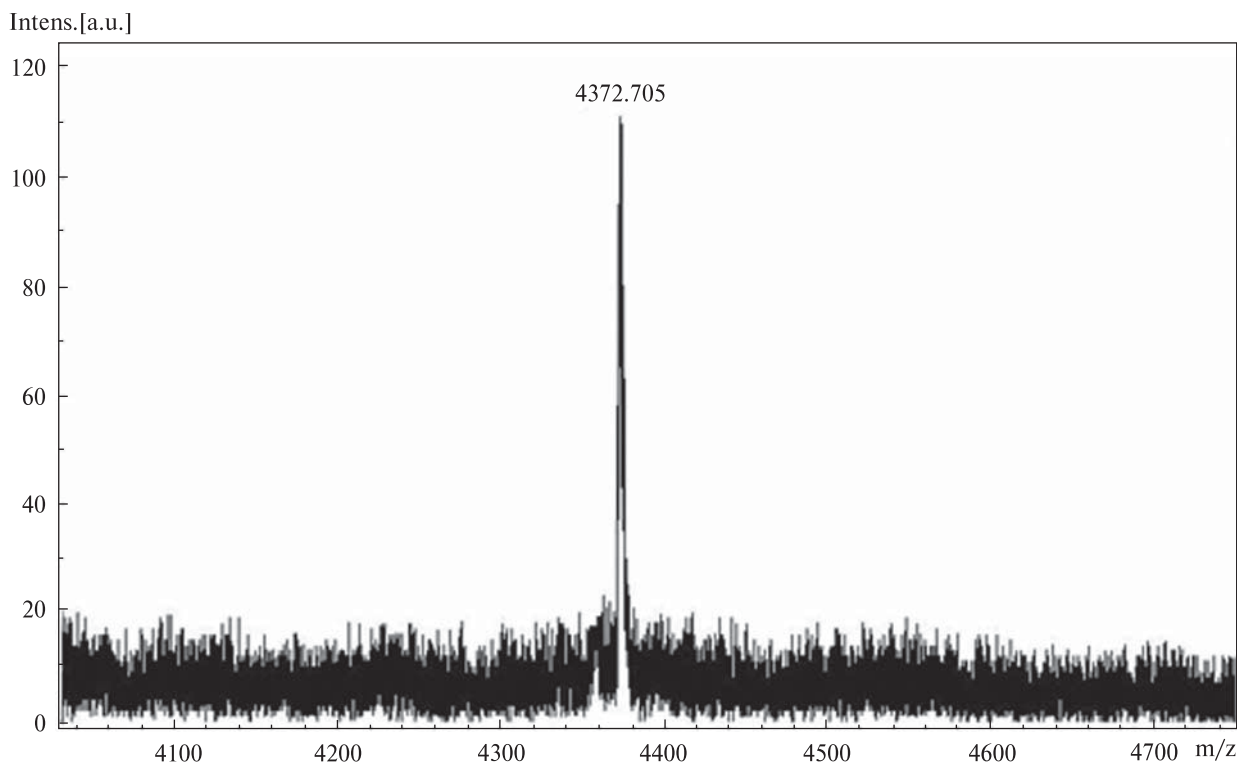


Рис. 7. Масс-спектр ВЭЖХ-фракции со временем удерживания 59,8 мин (выделена из тканевого экстракта пигментного эпителия), полученный с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии на приборе Ultraflex 2 («Bruker», Германия). Основной сигнал $m/z = 4372,705$

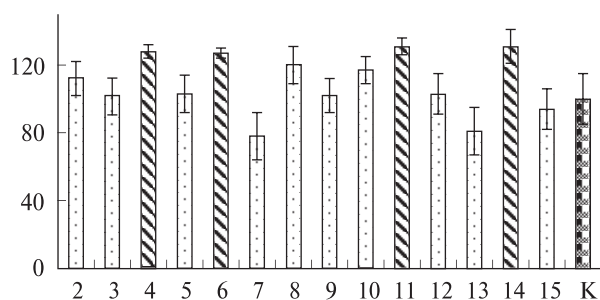


Рис. 8. Мембранотропная активность комплекса «регуляторный белок – модулятор», выделенного из тканевого экстракта радужки, *in vitro*: по горизонтали – степень десятикратного разбавления белковой фракции (исходная концентрация 0,030 мг/мл); по вертикали – величина мембранотропного эффекта, Ма, %. Остальные обозначения смотри на рис. 2.

сой 30, 60–70 кДа. Далее эти фракции разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С5. Масс-спектры двух пиков показали наличие белков $m/z = 15111,771$; $m/z = 66283,202$ Да (рис. 9).

Таким образом, было показано, что в состав биорегулятора ПЭ входит РП (4372,705 Да), а также фракция модулятора, представленная белками, значения молекулярных масс которых находились в диапазоне 15–70 кДа. Обращает внимание присутствие во фракции модулятора БСА, обнаруженного методами иммуноблоттинга и масс-спектрометрии.

Специфическую активность биорегулятора, выделенного из тканевого экстракта ПЭ, исследовали на разработанной модели стационарного культивирования тканей заднего отдела глаза взрослых тритонов *Pleurodeles waltl* [4, 11]. На этой же модели были исследованы фракции РП, модулятора, а также комплекса РП – модулятор.

Культивирование проводили в течение 3 сут. За это время в контроле происходила постепенная деградация всех тканей глаза (рис. 10, а). В сетчатке присутствовало значительное количество апоптирующих клеток, происходило изменение состояния клеток ПЭ: нару-

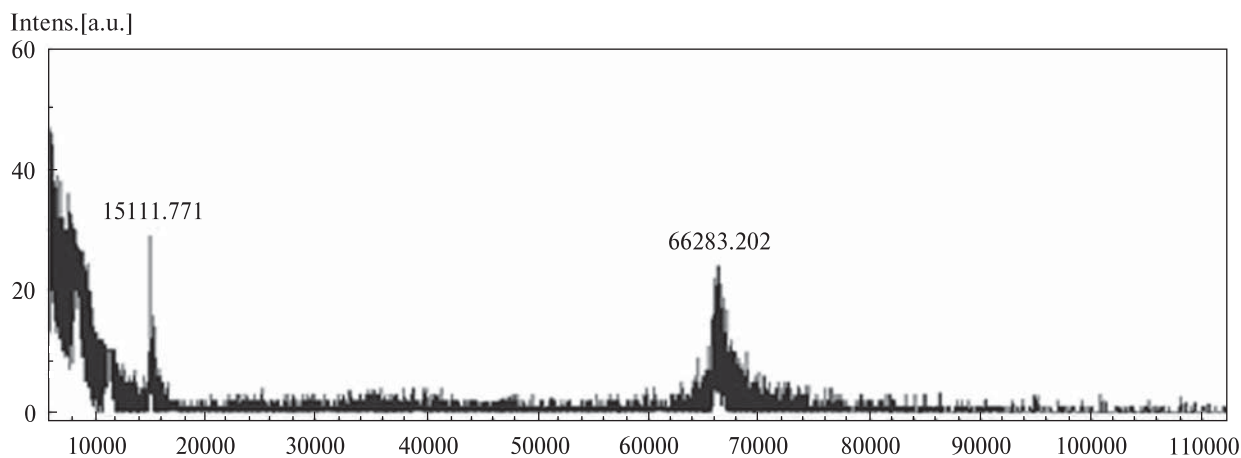


Рис. 9. Масс-спектр белка ПЭ (пик 10), полученный с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии на приборе Ultraflex 2 («Bruker», Германия). Основные сигналы: $m/z = 15111,771$; $m/z = 66283,202$

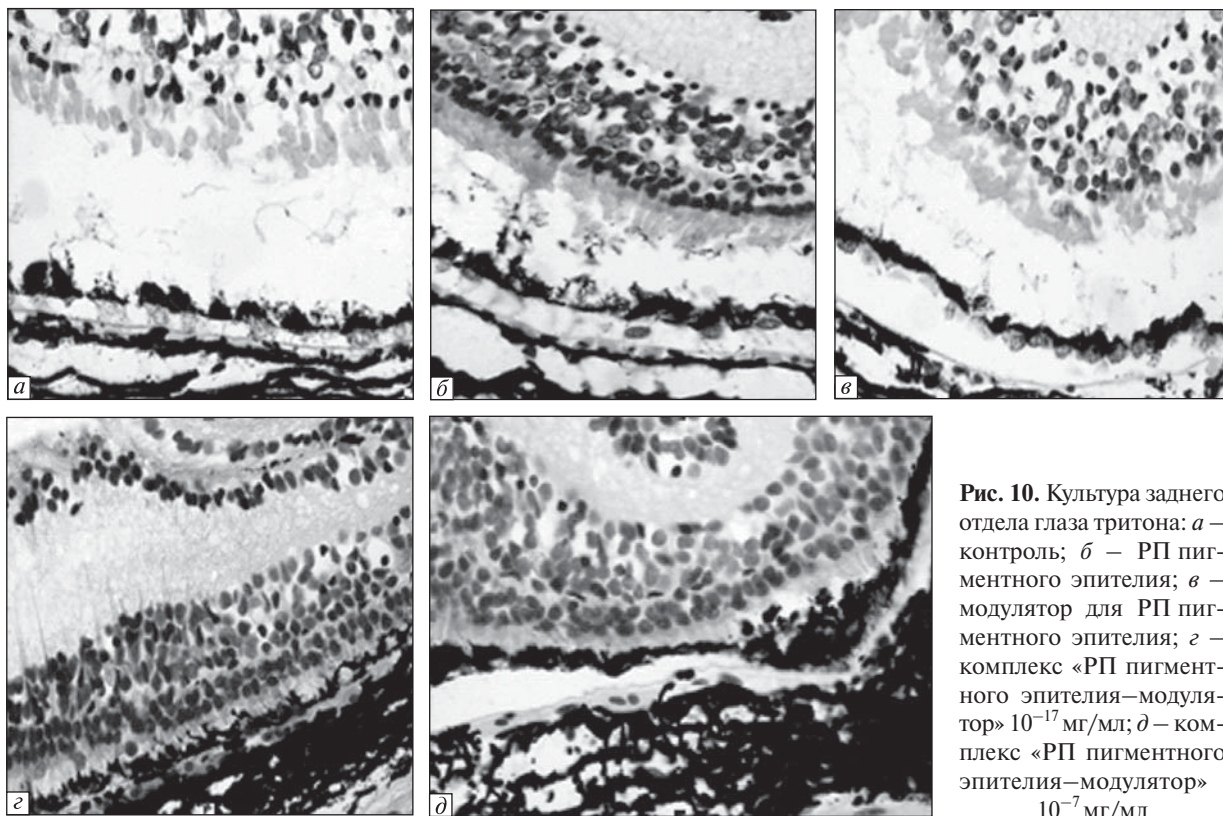


Рис. 10. Культура заднего отдела глаза тритона: *a* – контроль; *б* – РП пигментного эпителия; *в* – модулятор для РП пигментного эпителия; *г* – комплекс «РП пигментного эпителия–модулятор» 10^{-17} мг/мл; *д* – комплекс «РП пигментного эпителия–модулятор» 10^{-7} мг/мл

шалась адгезия в пласте между отдельными клетками, пигмент смещался на апикальную сторону, наблюдали частичную гибель клеток ПЭ. Кроме того, было отмечено нарушение адгезивных взаимодействий между сосудистой оболочкой и ПЭ, а также между отростка-

ми фоторецепторов и клетками ПЭ. В склеральной оболочке между коллагеновыми волокнами образовались полости.

РП, выделенный из тканевого экстракта ПЭ и внесенный в среду культивирования, оказывал некоторый протекторный эффект на ПЭ.

Несмотря на то, что в опытных культурах так же, как и в контроле, наблюдали значительную деградацию клеток сетчатки, входящих в апоптоз, воздействие РП способствовало поддержанию контактных взаимодействий между ПЭ и сосудистой оболочкой, статуса клеточной дифференцировки и адгезии эпителиальных клеток друг с другом. Кроме того, в склере сохранились пространственное расположение коллагеновых волокон и отсутствие полостей (рис. 10, б).

Состояние тканей заднего отдела глаза после культивирования с добавлением модулятора, выделенного из тканевого экстракта ПЭ, было приближено к состоянию тканей в контроле (рис. 10, в). Это выражалось в практически полной гибели клеток сетчатки, входящих в апоптоз, нарушении адгезии между сетчаткой, ПЭ и сосудистой оболочкой, а также статуса дифференцировки клеток ПЭ (смещение пигмента на апикальную сторону, нарушение адгезии между клетками в монослое, гибель самих клеток). В склере отмечены значительные полости, образующиеся в результате деградации коллагеновых волокон.

Совершенно иную картину наблюдали при добавлении в среду культивирования при СМД комплекса РП — модулятор, выделенного из тканевого экстракта ПЭ (рис. 10, г). В этом эксперименте удалось выявить наибольшую сохранность тканей заднего отдела глаза. Между отростками фоторецепторов, монослоем ПЭ и сосудистой оболочкой отмечены плотные адгезионные взаимодействия. В отличие от других опытов в сетчатке наблюдали незначительное количество апоптирующих клеток. Клетки ПЭ поддерживали статус клеточной дифференцировки, что выражалось в равномерном распределении пигмента и их плотном взаимодействии друг с другом. Происходило сужение сосудистой оболочки. Состояние ткани склеры приближено к интактной: более плотные взаимодействия между коллагеновыми волокнами, чем в контроле.

В случае культивирования тканей заднего отдела глаза с добавлением комплекса РП — модулятор в дозах лигандо-рецепторного взаимодействия (10^{-7} мг/мл) эффект на состояние тканей в эксперименте был менее выраженным (рис. 10, д). В отличие от контроля

наблюдали адгезионные взаимодействия между сетчаткой, ПЭ и сосудистой оболочкой на протяженном участке заднего отдела глаза с незначительными нарушениями в некоторых местах. Большая часть клеток сетчатки, как и в контроле, находилась в апоптическом состоянии. Следует отметить, что в монослое клеток ПЭ поддерживались адгезионные взаимодействия, пигментные гранулы распределялись равномерно по поверхности клеток, что указывало на стабильное состояние дифференцировки данных клеток в указанных условиях по сравнению с контролем. Состояние склеральной оболочки не отличалось от контроля.

Таким образом, наиболее выраженным протекторным действием на ткани заднего отдела глаза обладает комплекс РП — модулятор, выделенный из тканевого экстракта ПЭ, в СМД. Можно предположить, что в тканях заднего отдела глаза, в которых транспорт биологически активных веществ из кровяного русла и в пределах ткани осуществляется в основном за счет переноса веществ по межклеточному пространству, эти комплексы, возможно, функционируют не только как биорегуляторы, но играют принципиальную роль в процессах метаболизма и транспорта.

*V.P. Yamskova, M.S. Krasnov, V.S. Skripnikova,
A.A. Molyavka, A.P. Ilyina, D.V. Margasyuk,
A.V. Borisenko, B.B. Berezin, I.A. Yamskov*

MODULATORS OF ACTIVITY OF THE REGULATORY PROTEINS ACTING AT MICRODOZES

New, previously not studied bioregulators active in the ultra low dozes corresponding of 10^{-8} – 10^{-17} mg/ml have been isolated from vitreoretinal tissue of eye. It has been shown that these bioregulators comprise some regulatory peptides-modulators represented by proteins with molecular weights 15–70 kDa one of which is bovine serum albumin. Correlation between the nanosize of bioregulators and their ability to show activity in ultra low dozes is established.

*В.П. Ямскова, М.С. Краснов, В.С. Скрипникова,
А.А. Молявка, А.П. Іліна, Д.В. Маргасюк,
А.В. Борисенко, Б.Б. Березін, І.А. Ямсков*

МОДУЛЯТОРИ АКТИВНОСТІ РЕГУЛЯТОРНИХ БІЛКІВ, ЩО ДІЮТЬ В МІКРОДОЗАХ

З тканин вітреоретинальної ділянки ока виділено нові, раніше не вивчені біорегулятори, що активні у надмалих дозах, відповідних 10^{-8} – 10^{-17} мг білка/мл.

Встановлено, що до складу цих біорегуляторів входять регуляторні пептиди, модулятори, що представлені білками з молекулярними масами 15–70 кДа, одним з яких є альбумін сироватки крові. Встановлено зв'язок між нанорозмірним станом біорегуляторів та їх здатністю проявляти активність у надмалих дозах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканеспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекуляр. биология. — 1977. — **11**. — С. 1147–1154.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферация // Журн. общ. биологии. — 1991. — **52**. — С. 181–191.
3. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. Экспериментальные доказательства роли физико-химических факторов в механизме биологического действия сверхмалых доз // Рос. хим. журн. ЖРХО им. Д.И. Менделеева. — 1999. — **43**, № 5. — С. 34–39.
4. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П., Богуславский Д.В., Ямсков И.А. Регуляторные белки тканей глаза позвоночных // Радиация биология и радиозекология. — 2003. — № 3. — С. 265–268.
5. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezhin V.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses 1. Isolation, purification and physicochemical properties // Biochemical Physics Frontal Research / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Bulgakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. — New York : Nova Sci. Publ. Inc, 2007. — P. 61–70.
6. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Filatova A.G., Yamskov I.A. Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions // New Trends in Biochemical Physics Research / Eds S.D. Varfolomeev et al. — New York: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. — P. 73–82.
7. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses // Biochemical Physics Frontal Research / Eds S.D. Varfolomeev et al. — New York : Nova Sci. Publ. Inc, 2007. — P. 35–45.
8. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. Regulatory protein from Bovine Cornea : Localization and biological activity // Biochemical Physics Frontal Research / Eds S.D. Varfolomeev et al. — New York: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. — P. 47–59.
9. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Приклад. биохимия и микробиология. — 2004. — **40**, № 4. — С. 407–413.
10. Ямскова В.П., Ямсков И.А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах // Рос. хим. журн. ЖРХО им. Д.И. Менделеева. — 1999. — **43**, № 2. — С. 74–79.
11. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. РАН. Сер. биол. — 2003. — № 1. — С. 22–36.
12. Stepanek P. Dynamic Light Scattering. The method and some applications / Ed. W. Brown — Oxford: Clarendon Press, 1993. — P. 177.
13. Филонов А.С., Гаврилко Д.Ю., Яминский И.В. Программное обеспечение для обработки трехмерных изображений «ФемтоСкан Онлайн». — М.: Центр перспективных технологий, 2005. — С. 89. (<http://www.nanoscopy.net>).
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — **227**. — P. 680–685.
15. Ямскова В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс // Биофизика. — 1978. — **23**. — С. 428–432.
16. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. Analysis of a regulatory peptide from the bovine eye lens : Physicochemical properties and effect on cataract development in vitro and in vivo // Biochemical Physics Frontal Research / Eds S.D. Varfolomeev et al. — New York : Nova Sci. Publ. Inc., 2007. — P. 21–33.

Поступила 21.10.08