

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет физико-математических и
естественных наук

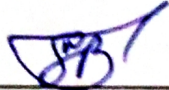
Кафедра «Общая биология и
биохимия»

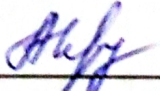
Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
на тему
«СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО И
ПЕПТИДНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ НАЗЕМНЫХ МОЛЛЮСКОВ»

Студент  Малащенко Татьяна Андреевна

Научный руководитель  Соловьев В.Б.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Невитов М.Н.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.18 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 15.06.18 № 5)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Регуляторные пептиды и их обмен	6
1.2. Особенности структурной и функциональной биохимии брюхоногих моллюсков.....	144
1.3. Пищеварительная система брюхоногих моллюсков и функции гепатопанкреаса.....	233
1.4 Биохимический состав печени брюхоногих моллюсков	244
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	299
2.1. Материал исследования.....	299
2.2 Методы исследований	299
2.2.1 Определение содержания белковых веществ методом Лоури	299
2.2.2 Метод гель-фильтрации.....	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	322
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Улитки являются представителями класса Брюхоногие типа Моллюски, имеющие широкий ареал распространения. Представители класса Брюхоногих имеют большое разнообразие из-за чего сложно привести их общую характеристику. Несмотря на это можно точно выделить такой общий признак как поворот торсия, т. е. поворот внутренностного мешка, относительно ноги на 180° против часовой стрелки. У многих представителей гастропод есть раковина, которая обычно закручена ассиметрично. Также у гастропод имеется нога, служащая для ползания по различным поверхностям.

Предками современных наземных моллюсков являются морские представители. Чтобы выйти на сушу гастроподам потребовалось много приспособлений для нормальной жизнедеятельности, начиная с усовершенствования легочного дыхания, заканчивая защитой организма от различных раздражителей окружающей среды.

Веками люди использовали улиток в качестве пищи и для лечения различных заболеваний. Слизь улиток и слизней были использованы время от времени для лечения кожи во времена древних греков. Как сообщается, Гиппократ рекомендовал использовать измельченных улиток, чтобы облегчить воспаление кожи. Но спустя время целебные свойства слизи улиток были забыты. Лишь около 20 лет назад чилийские фермеры, которые обрабатывают улиток для французского рынка, обнаружили, что у них быстро исчезли повреждения кожи без каких-либо шрамов. С этого момента у ученых вновь начал возрастать интерес к такому биологическому объекту как моллюски.

В различных публикациях было описано, как моллюски используются в Италии для лечения дерматологических заболеваний. Слизь, собранная из улитки, втирается в кожу для лечения дерматита, воспаления, мозоли, и прыщей, также способствует заживлению ран [62].

Секрет желез улиток содержит ряд важнейших биологически активных компонентов: коллаген, гликолевая кислота, аллантиин, натуральные антибиотики, белки, пептиды и витамины. Состав слизи аналогичен составу кожи человека, благодаря чему он имеет регенерирующее действие на кожу человека путем удаления шрамов и морщин.

Слизь моллюсков обладает бактерицидными свойствами, так как содержит лектины, которые могут прилипать к бактериальным клеткам. Таким образом, лектины лишают бактерий их способности проявлять патогенные свойства. Данные исследований показали, что слизь имеет специфические антибактериальные свойства против различных бактериальных штаммов.

Кроме возможности использования гастропод в медицине, также они имеют широкий интерес у экологов. Быстрое развитие промышленности, а, следовательно, увеличение отходов, отрицательно сказывается на экосистеме. Для преждевременного предупреждения и устранения загрязнений с промышленных производств, которые могут плохо сказываться на нормальной жизнедеятельности организмов, ученые занимаются поисками биомаркеров. Так как моллюски распространены повсеместно, они хорошо подходят для этой роли. Удобство в выборе гастропод в качестве биоиндикаторов заключается в использовании их в краткосрочных лабораторных и полевых экотоксических исследованиях.

Существует интерес в исследовании биохимического состава гепатопанкреаса (печени) наземных моллюсков, так как он выполняет функции не только пищеварительной железы, но также участвует в выделении продуктов обмена и выполняет иммунологические функции.

На настоящий момент мало сведений о пептидной составляющей гепатопанкреаса брюхоногих моллюсков. Поэтому для эксперимента нами были взяты представители двух семейств, обитающих в домашних и диких условиях. Проведение сравнительной характеристики на уровне

классификации и среды обитания, поможет показать большую картину о пептидном составе брюхоногих моллюсков.

Таким образом, **цель работы** – изучить белковый и пептидный состав печени наземных моллюсков.

Задачи исследования:

- 1) Определение белкового состава гепатопанкреаса улитки *Achatina fulica*
- 2) Определение пептидного состава гепатопанкреаса улитки *Achatina fulica*
- 3) Определение белкового состава гепатопанкреаса улитки *Helix pomatia*
- 4) Определение пептидного состава гепатопанкреаса улитки *Helix pomatia*
- 5) Сравнительная характеристика

По результатам исследования опубликованы 3 статьи, сделано 2 доклада на студенческих конференциях.

Магистерская работа написана на 60 листе, содержит 9 рисунков, 10 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 80 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Регуляторные пептиды и их обмен

В любом многоклеточном организме существуют регуляторные системы, которые объединяют различные по строению и функциям клетки в единое целое. К таким системам относятся: иммунная, которая обеспечивает защиту организма от чужеродных агентов, включая болезнетворных; нервная, реагирующая на изменение окружающей среды и обеспечивающая быстрые ответные реакции; эндокринная, работающая медленнее нервной, но ее эффективность сохраняется достаточно долго [12,16]. Одним из звеньев, объединяющих все три системы, служат регуляторные пептиды. Они представляют собой полифункциональную группу биологически активных веществ, которым отводится важная роль известных природных биорегуляторов [38].

Большинство регуляторных пептидов содержат в своем составе от 2 до 50 аминокислот. Пептиды, насчитывающие не более 20 аминокислот относят к группе олигопептидов, а в структуре которых насчитывают от 20 до 100 аминокислотных остатков – к группе полипептидов. Регуляторные пептиды относят как к гистогормонам, опираясь на их относительно короткое время полураспада и на участие в процессах регуляции на тканевом уровне, так и к нейромодуляторам [2, 19].

Физиологическая активность регуляторных пептидов разнообразна. Их рассматривают в качестве адапторогенов, нейротрансмиттеров, модуляторов, цитокинов и других регуляторов [10].

Функции любого регуляторного пептида определяются активностью его свободных форм за счет комплиментарного связывания лигандов с активным центром клеточного рецептора [3].

Благодаря многим исследованиям и экспериментальным данным известно, что регуляторные пептиды (тиролиберин, энкефалин, окситоцин и

некоторые другие) обладают поверхностно-активными свойствами и способностью их молекул модифицировать липидные моно- и бислои [21]. Ряд регуляторных пептидов тесно связан с механизмами обучения и памяти. Это, прежде всего, фрагменты АКТГ (АКТГ₄₋₇, АКТГ₄₋₁₀) и вазопрессин, которые ускоряют обучение и являются стимуляторами внимания и процесса консолидации памяти. Регуляторные пептиды участвуют в регуляции деятельности сердечнососудистой системы. Выявлено, что пептиды регулируют системы специфического и неспецифического иммунитета (тафцин, иммунопоэтины, тимозины, кортиколиберин, вещество Р, нейротензин и др.). Также предполагают участие ряда пептидов в развитии опухолей. [4, 5]. Пептиды семейства панкреатических пептидов, а именно нейропептид Y, панкреатический полипептид и пептид YY, действуют как гормоны, нейротрансмиттеры и нейромодуляторы. Действия этих пептидов связаны, по меньшей мере, с шестью подтипами Y-рецепторов трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком [77]. Все члены данного семейства оказывают множественные биологические эффекты, в том числе играют ключевую роль в регулировании аппетита и приема пищи [52]. Недавние исследования нейропептида Y показали, что он оказывает регуляторный эффект на пролиферацию, дифференциацию и выживаемость стволовых клеток, что, как предполагается, применимо для лечения большого количества заболеваний [61].

Классификация регуляторных пептидов учитывает их химическую структуру, физиологические функции и происхождение. Затруднение классификации вызывает их полифункциональность.

С учетом физиологических и биохимических свойств регуляторных пептидов было предложено их подразделять на три класса:

- I класс - пептиды обладают дистантным действием и высоким сродством к рецепторам и по основным свойствам схожи с олигопептидными гормонами: вазопрессин, окситоцин, соматостатин, эндогенные опиаты и др.

- II класс - пептиды обладают дистантным действием и относительно низким сродством к рецепторам; синтезируются из неспецифических белков (коллаген, эластин): гидропролины, энтеростатины и др.

- III класс - пептиды локального действия (органный и тканевый), например, нейротрофины.

Современная классификация регуляторных пептидов основывается на их структуре, функциях и местах синтеза в организме. В настоящее время выделяют 20 семейств регуляторных пептидов. Наиболее изученные из них представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Семейства регуляторных пептидов (По Н. Г. Левицкой)

Семейства	Место образования	Основные представители	Наиболее важные биологические свойства
Ринизинг-факторы гипоталамуса	Большинство отделов головного мозга (включая гипоталамус) и в ряде внутренних органов (например, поджелудочная железа)	Соматостатин, соматолиберин, тиролиберин, кортиколиберин, гонадолиберин, меланолиберин	Регулируют выделение тропных гормонов гипофиза, контролируют когнитивные функции (прежде всего память и внимание), тревожность, эмоциональность, сложные инстинкты (половой, пищевой, исследовательский и др.), вегетатику, иммунитет.

Продолжение таблицы 1

Семейства	Место образования	Основные представители	Наиболее важные биологические свойства
Опиоидные пептиды	Все отделы ЦНС и большинство внутренних органов	Мет- и лей-энкефалины, α -, β -, γ -эндорфины, динарфины, неоэндорфины	Регуляция болевого чувства, эмоций, тревожности, поведенческих реакций и ряда сложных инстинктов (прежде всего, исследовательский и пищевой), двигательной активности, вегетативных функций, иммунитета.
АКТГ	Гипофиз, КБП, промежуточный мозг	АКТГ ₁₋₃₉ , АКТГ ₁₋₂₅ , АКТГ ₄₋₁₀ , АКТГ ₄₋₇ ; α -, β -, γ -МСГ и их фрагменты	Обладают гормональными функциями (АКТГ ₁₋₃₉ и АКТГ ₁₋₂₅ стимулируют синтез глюкокортикоидов корой надпочечника; α -, β -, γ -МСГ - процессы пигментации), стимулируют внимание, память, обучаемость; АКТГ регулирует ряд вегетативных функций (липолиз, уровень артериального давления)

Продолжение таблицы 1

Семейства	Место образования	Основные представители	Наиболее важные биологические свойства
Вазопрессина	КБП и промежуточный мозг (преимущественно гипоталамус)	Вазопрессин, окситоцин	Обладают гормональными функциями (вазопрессин угнетает диурез и стимулирует тонус сосудов, а окситоцин- стимулятор сокращения матки при родовой деятельности), принимают участие в формировании долговременной памяти (вазопрессин стимулирует, а окситоцин угнетает), внимания; вазопрессин регулирует вегетативные функции.
Панкреатические пептиды	Органы ЖКТ, ЦНС	Нейропептид Y	Регулирует формирование тревожности (анксиолитическое действие), пищевой инстинкт (стимуляция), тонус сосудов головного мозга (стимуляция), функцию ЖКТ.

Продолжение таблицы 1

Семейства	Место образования	Основные представители	Наиболее важные биологические свойства
Глюкагонсекретины	Органы ЖКТ, ЦНС (особенно КБП)	Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП)	Регулирует половой инстинкт (стимуляция), тонус сосудов и бронхов (снижение), функцию ЖКТ.
Гастроиноподобные пептиды	Органы ЖКТ, ЦНС	Холицистокинин-8, холицистокинин-4	Регулируют формирование тревожности, поведенческих реакций, пищевого инстинкта (снижение), тонус сосудов головного мозга (стимуляция), функцию ЖКТ.
Тахикинины	Органы ЖКТ, и различные отделы ЦНС	Субстанция Р	В ЦНС выполняет нейромедиаторную функцию, а также регулирует болевую чувствительность, воспалительную реакцию, артериальное давление, моторику ЖКТ и чувствительность к стрессу
Нейротензины	Разные отделы ЦНС	Нейротензин	Обладает обезболивающим, гипотермическим и гипотензивным действием

Окончание таблицы 1

Полифункциональность пептидов объясняется их особенностью структуры. Пептиды имеют несколько лигандных групп связывания, которые предназначены для разных клеточных рецепторов. Каждый из регуляторных пептидов способен индуцировать или ингибировать выход ряда других пептидов, то есть эффекторная последовательность совокупности пептидов образует пептидный регуляторный континуум. В результате первичные эффекты того или иного пептида могут развиваться в виде цепных и каскадных процессов [1].

Общий принцип синтеза всех изученных регуляторных пептидов состоит в образовании относительно больших пептидов-предшественников (препропептидов), из которых после завершения трансляции выщепляются протеазами соответствующие пептиды [13]. Иногда из одного предшественника появляется целая группа пептидов, необходимая для успешного приспособления различных систем организма к определенным изменениям окружающей среды. Сам белок-предшественник не обладает активностью входящих в его структуру пептидов, но при необходимости из него можно быстро (значительно быстрее, чем путем рибосомального синтеза) получить необходимые организму продукты [11,16]. Пептиды-предшественники состоят из одного или более числа последовательностей регуляторного пептида и сигнальной последовательности, состоящей из 15-20 остатков гидрофобных аминокислот. Сигнальная последовательность способствует миграции предшественника внутри клетки после завершения трансляции в шероховатой эндоплазматической сети [1]. Сигнальная последовательность препропептидов необходима для взаимодействия с рецепторами эндоплазматического ретикулума и переноса предшественника нейропептида в просвет ретикулума. Полипептиды подвергаются посттрансляционному процессингу, чтобы получить их активные формы для дальнейшего функционирования [1, 18].

Процессинг биологически активных пептидов осуществляется в процессе передвижения молекул пропептидов по гранулярному

эндоплазматическому ретикулуму, комплексу Гольджи и в секреторных везикулах [8, 9, 33]. Последние содержат набор ферментов процессинга, специфичных для данной клетки или ткани, а также специальные системы поддержки оптимальной pH среды [14].

Процессинг внутри секреторных гранул включает в себя эндо- и экзопроотеолитические реакции, а также гликолизирование, сульфатирование, амидирование и фосфорилирование N- и C-концевых аминокислотных остатков, что предохраняет образовавшийся продукт от дальнейшей деградации [1]. Эндопротеолиз осуществляется при действии трипсиноподобных протеиназ (пропиомеланокортин-превращающего фермента [47], продинорфин-превращающего фермента [37], тиоловой прогормонконвертазы [22], субтилизиновых эндопептидаз фурина, PC1, PC2, PC3 и PC4). В результате происходит расщепление пропептидов по парам остатков основных аминокислот [13, 73].

Продукт, образовавшийся после действия эндопептидаз, далее подвергается экзопроотеолизу с участием аминопептидазо-В- и карбоксипептидазо-В-подобных ферментов. В результате происходит удаление «лишних» N- и/или C-концевых остатков основных аминокислот.

Многие препропептиды образуют промежуточное соединение с гликозидами, которые оказывают стабилизирующее действие на некоторых стадиях процессинга и влияют на выбор мест атаки протеиназами. Точное выщепление пептидов протеиназами объясняется наличием в последовательности аминокислот препропептидов парных остатков, которые в первую очередь атакуются протеиназами, близкими по характеру действия к катепсину В и трипсину. В этой фазе процессинга выщепляемые фрагменты уже представляют собой активные пептиды. Эти фрагменты могут подвергаться дальнейшему протеолизу с образованием новых регуляторных пептидов. На этой фазе участвуют не только трипсиноподобные протеиназы, но и ряд других протеиназ [1].

Регуляция метаболизма активных регуляторных пептидов определяется большим спектром воздействий, изменяющих гомеостаз на любом уровне - уровне клетки (транскрипция, трансляция и посттрансляционный процессинг), ткани (секреция и инактивация нейропептидов), а также на уровне организма в целом. Именно эти морфогенетические и биохимические особенности биогенеза и определяют уровень активных регуляторных пептидов в организме.

Тканевая специфичность может быть связана с различным набором ферментов в разных тканях или с различными способами регуляции их активности. Поэтому представляет интерес изучение ферментов процессинга со сходной (но не идентичной) субстратной специфичностью. Такие исследования интересны не только для выяснения вопросов, связанных с функционированием данных ферментов, но и для понимания механизмов образования различных нейропептидов из одних и тех же предшественников в разных тканях.

1.2. Особенности структурной и функциональной биохимии брюхоногих моллюсков

Брюхоногие моллюски являются хорошим объектом для исследования. Многих ученых интересуют биохимические особенности этих представителей беспозвоночных животных [66].

Улитки хорошо адаптировались к различным экосистемам, как на суше, так и в воде. Иногда они подвергаются воздействию суровых условий в их естественных средах обитания. Наземные брюхоногие должны были выработать стратегии выживания, чтобы справиться с изменениями окружающей среды [45,72]. Одной из таких стратегий выживания является способность наземных улиток регулировать и выделять металлические микроэлементы и детоксифицировать несущественные вредные ионы металлов. Переносимость к накоплению ионов металла связана с наличием

металлотионеинов [58]. Металлотионеины относятся к семейству низкомолекулярных белков, имеющих высокое содержание цистеина. Но металлотионеины гастропод имеют уникальные особенности по сравнению с металлотионеинами других организмов. В частности, в химическом составе *Helix pomatia* имеется медьспецифический металлотионеин, который играет важную роль в синтезе гомеостаза металлов; и также есть наличие кадмий-селективного металлотионеина, обнаруженного в гепатопанкреатической ткани, который участвует в детоксикации Cd^{2+} и реакции стресса [27, 31]. Наличие знаний о способности улитками накапливать ионы металлов в органах и тканях помогает в мониторинге окружающей среды [26, 31].

Также высокая способность моллюсков к выживанию в окружающей среде в течение миллионов лет появилась благодаря наличию в гемолимфе беспозвоночных С-реактивного белка. Экспериментально было доказано, что данный белок эффективен против сальмонеллы и сенной палочки, нарушая гомеостаз клетки, снижает статус глутатиона, который сопровождается повышенной скоростью перекрестного окисления липидов, что ведет к апоптозу клетки [50].

Брюхоногие моллюски - травоядные животные, имеющие способность переваривать целлюлолитический материал. Исследуя желудочно-кишечный сок улиток Ахатин, было найдено три эндо- β -1,4-глюканазы, которые способствуют разрушению растительных клеток и усвоению питательных веществ. Одним из таких новых ферментов стал AfEG22, который имеет кислый оптимум pH и обладает хорошей термостойкостью. Данные свойства фермента говорят о том, что улитка может стать источником для получения термостабильных ферментов. Ацидофильные свойства фермента могут быть использованы в биотехнологии, например, кислые целлюлазы могут использоваться в качестве добавок в корма для животных. Также AfEG22 может стать потенциальным ферментом в производстве биоэтанола из целлюлозы [74].

Широко известна роль лектина в жизни клеток животных и растений. У виноградной улитки лектины под название *Helix pomatia* агглютининов секретируются белковой железой, которая продуцирует перивителлиновую жидкость, состоящую из белковых и полисахаридных комплексов, которые покрывают каждое оплодотворенное яйцо. Этот лектин обладает свойством агрегирования бактерии, такие как стрептококки группы С, а также способен связываться с поверхностью вируса герпеса [68].

В последнее время во многих исследованиях используют лектин-углеводсвязывающие белки неиммунного происхождения для выявления изменений гликозилирования в раковых клетках. Лектин из *Helix pomatia* является многообещающим лектином в этом отношении. Известно, что *Helix pomatia* агглютинин является полезным инструментом для прогнозирования опухолей груди, желудка и других злокачественных новообразований. *Helix pomatia* агглютинин распознает множество белков, несущих абберантные структуры гликанов при колоректальном раке. Локализация *Helix pomatia* агглютинин-связывающих эпитопов с белками клеточных мембран может способствовать метастатическому поведению раковых клеток *in vivo* [63].

Давние исследования доказали наличие в гемолимфе моллюсков гемоцианинов. Они представляют собой олигомерные медьсодержащие гликопротеины, которые функционируют как носители кислорода в гемолимфе моллюсков и членистоногих. Молекулы гемоцианина моллюсков структурированы в декамерные (у головоногих) или дидекамерные (у брюхоногих) субъединиц с молекулярной массой 350-450 кДа. Полипептидные цепочки субъединиц содержат семь или восемь глобулярных функциональных единиц, в зависимости от вида. Функциональные единицы имеют биядерный активный сайт меди, способный обратимо связывать одну молекулу кислорода. Активный сайт состоит из двух близко расположенных ионов меди, каждый из которых координирован тремя гистидиновыми лигандами. Известно, что гемоцианины стимулируют иммунную систему, неспецифически взаимодействуя с макрофагами, клетками CD⁴⁺ и CD⁸⁺, что

приводит к сильному гуморальному и клеточному иммунному ответу. На сегодняшний момент свойства гемоцианинов моллюском рассматриваются учеными как перспектива в лечении раковых опухолей [34, 64].

Как известно, липиды выполняют в биологических системах много функций, например, энергетические и структурные. Было установлено, что липиды улиток участвуют в выживаемости животных в условиях физиологического стресса, таких как длительное голодание, когда быстро истощаются запасы углеводов. Так как липиды являются структурными компонентами биологических мембран, следовательно, изменение их количества и состава могут возникать, когда изменяется метаболическое состояние улиток, происходящих в ответ на стрессовые факторы. Экспериментально было доказано, что метаболизм триглицеридов улиток, на примере *A. fulica*, больше зависит от изменений фотопериода. Результаты данных исследований являются важными для понимания и оценки метаболического состояния *A. fulica*. Они могут представлять собой полезные знания для контроля численности улиток в странах, где они считаются сельскохозяйственными вредителями или переносчиками гельминтных заболеваний [48].

Многие ученые и исследователи давно доказали наличие в тканях позвоночных гликозаминогликанов и протеогликанов, которые являются обязательными компонентами межклеточного матрикса и играют важную роль в межклеточных взаимодействиях [7]. Сравнительно недавно эти компоненты были обнаружены и у брюхоногих моллюсков.

Протеогликаны такие как версикан, перлекан и агрекан были найдены впервые в мягких тканях улиток Ахатины [44]. Перлекан и версикан распределены по всему покрову улитки. Аналогичная картина была описана для коллагена типа I и у других брюхоногих [56]. Дальнейшие исследования показали локализацию протеогликанов во внеклеточном матриксе из субэпидермальной соединительной ткани. Реакционная способность для

версикана и перлекана особенно сильна в слизистой железе, яйцеводе и стопе.

Распределение HS-протеогликана было более организовано в слизистой железе и маточной трубе с существенной иммунореактивностью в ацинарных эпителиальных клетках. Такое распределение HS-протеогликана предполагает определенную роль в поддержке ацинарных эпителиальных клеток, образуя базальную мембрану, окружающую эту структуру.

Сам биосинтез гликозаминогликановых ферментов показал широкое распределение гликозаминогликана в яйцеводе и тканях слизистых желез, которые окружены ацинарными клетками и пучками мышечных волокон, а также этот компонент можно встретить в покровах брюхоногих [35].

За последнее время накопились знания о процессах гликозилирования. Вообще гликозилирование белков клеточной поверхности представляет собой посттрансляционную модификацию, которая играет важную роль в клеточной адгезии, связи, взаимодействии и изменениях в патологических состояниях. К настоящему моменту учеными осуществлено много опытов в исследовании гликанов млекопитающих, а именно, их структуре и соответствующих биохимических путях, включая ответственных за это ферменты. Возможности гликозилирования других видов были изучены в том случае, когда знания по их гликанам были связаны с жизнью и здоровьем человека. Тем временем проводится все больше исследований по гликанам беспозвоночных из-за их потенциальной пользы применения в биотехнологии или для получения более глубокого понимания путей обработки необычных гликановых структур. Растет интерес к изучению О-связанных гликанов. Известно, что О-связанные гликаны играют важную роль в стабильности третичной структуры белка, модулируют активность ферментов, имеют главное значение для ряда процессов распознавания и являются детерминантами сортировки, направляющие модифицированный белок в клетке от места биосинтеза до его местоположения. У улиток моносахарид О-гликозилирования GalNAc часто удлиняется остатками 4-О-

Me-Gal в (1-3)- и (1-6)-положениях. Удлинение этого трисахаридного ядра одним или двумя гексозами с или без метильной группы проявляется у большинства видов улиток, тогда как дальнейшее удлинение или фукозилирование является редким. Гликозилирующий потенциал улиток важен в целом, потому что некоторые из них являются промежуточными хозяевами патогенов или вредителями сельского хозяйства. Широкое значение их способностей к гликозилорванию может показать цели борьбы с вредителями в ближайшем будущем [72].

Особый интерес представляет изучение не только внутренних органов улитки, но и слизи, выделяемой слизистыми железами. Железы разбросаны по всей поверхности тела моллюска, но особенно их много на подошве [17]. Слизь представляет собой клейкую или вязкую жидкость, прозрачную, белого или желтого цвета. Состав слизи варьирует в зависимости от вида, но имеет основные компоненты, встречающиеся у всех видов брюхоногих. Большую долю в ней занимает вода. Слизь состоит из сложной смеси протеингликанов, гликозаминогликанов, гликопротеиновых ферментов, гиалуроновой кислоты, медных пептидов, антимикробных пептидов и ионов металлов. В состав слизи входят неорганические вещества, белки и углеводы [46, 70]. Неотъемлемой частью в составе слизи является муцин, который обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эти антимикробные пептиды действуют не только как природные антибиотики, но также стимулируют многие элементы иммунной системы [78].

В современном мире особое внимание уделяется проблеме заболевания раком, в частности раком молочной железы. Как известно, рак молочной железы является одним наиболее распространенным в мире заболеванием у женщин. Ранее выявление и использование лучевой терапии, хирургии и химиотерапевтических препаратов, могут инвазивными методами уменьшить рак молочной железы. Но часто после такого лечения организм пациента травмируется побочными эффектами. Поэтому всё чаще проводятся

исследования в поисках терапии с менее побочными действиями на организм. Было доказано, что эффективными антигенными пептидами являются малые молекулы (< 50 аминокислот), которые могут действовать специфически против раковых клеток посредством мембранного механизма или нарушения работы митохондрий [32].

Пептидный состав слизи моллюсков начали изучать сравнительно недавно. В настоящее время в слизи улиток обнаружены антимикробные пептиды.

Антимикробные пептиды (AMPS) являются частью врожденного ответа, найденного среди всех классов живых организмов. Эти пептиды являются мощными широкого спектра антибиотиками, которые могут выступать в качестве новых терапевтических агентов.

Антимикробные пептиды способны убивать грамотрицательные и грамположительные бактерии, оболочные вирусы, грибки и даже раковые клетки [65]. Из-за своей уникальности и разнообразия AMPS были разделены на подгруппы в соответствии с составом и структурой их аминокислот [80]. Как правило, антимикробные пептиды имеют в своем составе от 12 до 50 аминокислот. Эти пептиды включают два или более положительно заряженных остатка, представленные аргинином, лизином, а в кислой среде гистидином [30, 59, 69].

Режимы действия, с помощью которых антимикробные пептиды убивают микробы и бактерии, специфичны для различных видов возбудителей [53, 57]. Первый контакт пептида с «жертвой» является электростатическим, что связано с анионными или гидрофобными свойствами большинства бактериальных поверхностей. Клеточные мембраны бактерий богаты кислыми фосфолипидами, такими как фосфотидил глицерин и кардиолипин. Полярные головки этих фосфолипидов сильно отрицательно заряжены, поэтому они в первую очередь атакуются антимикробными пептидами [24, 49]. Аминокислотный состав пептидов, а также их катионный заряд и размер позволяют им прикрепляться и встраиваться в

мембранный бислой клеток с образованием пор. Далее пептиды могут проникать в клетку и связываться с внутриклеточными жизненно необходимыми молекулами [23]. Такое внутриклеточное связывание может способствовать торможению синтеза клеточной стенки, изменению цитоплазматической мембраны, ингибированию ДНК, РНК, синтезу белка, ингибированию некоторых ферментов. Тем не менее, точный механизм уничтожения бактерий неизвестен.

Помимо подавления бактерий антимикробные пептиды имеют ряд иммуномодулирующих функций, действуя как хемокины или способствуя производству хемокинов [41].

Антимикробные пептиды являются превосходными кандидатами для использования их в качестве новых терапевтических агентов и дополнения к обычной терапии антибиотиками [65].

В ходе экспериментов из экстракта слизи улиток было выделено два пептида с антимикробным эффектом: Achasin и Mytimacin-AF. Achasin идентифицирован как пептид с молекулярной массой 59-150 кДа. Пептид обладает антимикробной активностью по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям. Механизм действия Achasin направлен на ингибирование образования пептидогликана и цитоплазматической мембраны. Благодаря своей активности данный пептид наиболее эффективен против золотистого стафилококка [28, 43 , 76].

Mytimacin-AF - новый, богатый цистеином антибактериальный пептид, принадлежащий к семейству пептидов mytimacins. Этот пептид состоит из 80 остатков аминокислот, включая 10 цистеина. Mytimacin-AF показал мощную антибактериальную активность в отношении грамотрицательных, грамположительных бактерий и грибковых *Candida Albicans*. Среди испытанных микроорганизмов, он оказал сильную противомикробную активность в отношении золотистого стафилококка с минимальной концентрации пептида от 1,9 мкг / мл и *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Mytimacin-AF имеет малую гемолитическую активность против человеческих эритроцитов [43, 75].

Исследования пептидного состава слизи не стоят на месте. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии были выделены фракции пептидов, имеющие противораковое действие на линии клеток рака молочной железы. Эти данные вносят хороший вклад в решении проблемы поиска терапии в лечении рака молочной железы, не имеющие побочных воздействий на организм в целом [32].

Часто улитки являются промежуточными хозяевами паразитов. Моллюски способны реагировать клеточным иммунным ответом на инфекцию паразита через факторы, растворимые в гемолимфе, которые активируют гемоциты. В некоторых двустворчатых моллюсках, после распознавания и инкапсуляции патогенов, активируется фенолоксидаза (PO), ответственная за меланизацию, а также фагоцитоз, что иногда может привести к элиминации паразитов.

Фенолоксидаза находится в гемолимфе в неактивной форме (proPO) и активируется внешними компонентами микроорганизмов, такими как β -1,3-глюканы и липополисахариды. Эти соединения индуцируют расщепление proPO в PO эндогенными сериновыми протеазами. Затем PO катализирует гидроксилирование монофенолов на о-дифенол с последующим их окислением до о-хинонов. В конце цепочки реакций образуется темный пигмент меланин, тем самым, способствуя асфексии патогенна. Фенолоксидазы являются медь связывающими белками и играют жизненно важную роль в иммунологическом защитном механизме тихоокеанской устрицы. Недавно было обнаружено, что у *A. fulica*, инфицированных легочным червем *Angiostrongylus cantonensis*, увеличивается активность в гемолимфе фенолоксидаз. Эти знания могут помочь в предупреждении заражения нематодами [25].

1.3. Пищеварительная система брюхоногих моллюсков и функции гепатопанкреаса

Класс *Gastropoda* (брюхоногие) – самый многочисленный класс в составе типа *Mollusca*. Основным признаком брюхоногих моллюсков является поворот (торсия) внутренностного мешка в процессе развития примерно на 180° против часовой стрелки. Общий план строения гастропод – коренастое тело с хорошо развитой ногой для ползания и хорошо дифференцированной головой несущей радулу, пару челюстей, пару глаз и одну или более пар сенсорных щупалец [6].

Несмотря на то, что моллюски беспозвоночные животные, они имеют сложную пищеварительную систему. Это связано с особенностью потребления пищи улитками. Общая схема пищеварительного канала моллюсков складывается из нескольких отделов: ротовой полости, глотки со слюнными железами, пищевода, желудка, средней кишки с печенью, задней или прямой кишки. Нижняя стенка глотки несет крупный мускулистый валик – одонтофор. На верхней стороне одонтофора лежит радула, состоящая из рогового слоя, на котором расположен ряд зубов. Радула моллюска соскабливает с поверхностей не только органические, но и несъедобные минеральные частицы. Поэтому в процессе питания получившуюся смесь нужно отсортировать на съедобные и несъедобные.

Пищеварительный тракт моллюсков состоит из передней, средней и задней кишок. Передняя кишка (ротовое отверстие, буккальная полость, глотка) и задняя кишка (прямая кишка и анус) имеют эктодермальное происхождение, в то время как средняя кишка (пищевод, желудок, слепые вырасты кишки и собственно кишечник) является производным энтодермы.

У высших гастропод имеется тенденция к смещению места впадения пищевода в желудок к переднему концу последнего.

Соскобленная радулой пища поступает в буккальную полость, где смешивается со слизью, образуя слизистый шнур, который перемещается в

пищевод. Выстилающие пищевод и желудок реснички передвигают слизистый шнур к желудку. Желудок представляет собой грушевидный мешок. На переднем расширенном конце в него впадает пищевод, а от заднего тонкого конца начинается кишечник. В кислой среде желудка улитки снижается вязкость слизи слизистого жгута, высвобождаются содержащиеся в нем частицы, которые уносятся от протостиля к сортировочному полю. С передним отделом желудка протоками соединяется гепатопанкреас (печень). Пищеварительная железа состоит из правой и левой долей. Они образованы массой плотно упакованных слепо замкнутых на свободном конце трубчатых выростов. Эпителий гепатопанкреаса выполняет железистую и абсорбционную функции. Также осуществляется секреция ферментов, которые необходимы для внеклеточного переваривания пищи в желудке, фагоцитоз мелких пищевых частиц и абсорбция продуктов пищеварения для их дальнейшей транспортировке в гемоцель. Кишечник начинается от переднего конца желудка, проходит через весь втрутенностный мешок и открывается анусом на правой стороне мантийной полости. В самом заднем отделе пищеварительного тракта, а именно в рактуме, осуществляется формирование, упаковка и временное сохранение фикалий. [15, 20].

1.4 Биохимический состав печени брюхоногих моллюсков

Одной из главных проблем современного общества является загрязнение окружающей среды. Развитие промышленности приводит к различным выбросам биологических и химических веществ в почву и водоемы. Токсины, загрязняющие водные и наземные экосистемы, приводят к отравлению и смерти животных, а также представляет риск для здоровья человека. Несмотря на современные инновационные методы определения токсинов в воде и почве, все равно есть большой интерес в нахождении и исследовании так называемых биоиндикаторов. На данный момент существует большое количество представителей растительного и животного

мира, которые могут послужить биоиндикаторами того или иного химического или биологического вещества, но продолжаются поиски в определении влияния токсинов как на отдельные функции, так и на тот или иной организм [60].

Брюхоногие моллюски являются теми самыми представителями животного беспозвоночного мира, которые на настоящий момент имеют интерес у ученых как потенциальный биоиндикатор.

Как известно насыщение водоемов биогенными элементами, вызванное чрезмерной антропогенной активностью, часто сопровождается возникновением потенциального токсина, продуцирующего цианобактерии [39]. Хорошо известно, что некоторые виды цианобактерий могут продуцировать цианотоксины, особенно гепатотоксические микроцистины, которые являются одной из наиболее опасных групп токсинов.

Экспериментально было доказано, что у брюхоногих моллюсков, обитающих в прибрежных районах мелких озер и прудов, в гепатопанкреасе накапливаются микроцистины с наивысшими концентрациями. Воздействие микроцистин на гепатопанкреас улитки можно увидеть гистологическими методами. После действия микроцистинов в гепатоцитах возможно наблюдать вакуоли и миелиноподобные остаточные тела, что указывает на очищение от апоптотических тел.

Исследуя лизосомы гепатопанкреаса, выяснилось, что они претерпевают морфологические и функциональные изменения, вызванные загрязненными веществами. В связи с этим лизосомы также могут служить биомаркерами при загрязнении окружающей среды [29].

Загрязнение почв тяжелыми металлами не маловажная проблема. Высокая биодоступность тяжелых металлов в почве играет решающую роль в накоплении их вдоль цепи питания. Этот фактор становится важным при оценке качества окружающей среды [67].

Находящиеся в почве потенциальные загрязняющие металлы (Cu, Zn, Cd и Pb) поглощаются растениями и далее эти металлы могут переноситься

вдоль цепи питания. Также металлы накапливаются в мертвых организмах. Поскольку улитки являются растительноядными животными и детритовыми организмами одновременно, они, поедая живую и мертвую растительность, могут накапливать в своем организме металлы. Это еще раз доказывает использование брюхоногих моллюсков в мониторинге окружающей среды как модель в определении накопления Cu, Zn, Cd и Pb в наземных экосистемах [36].

Во всем мире говорят о накоплении высоких концентраций тяжелых металлов в гепатопанкреасе улитки. Сравнивая наличие металлов в стопе и гепатопанкреасе улитки, экспериментально было доказано, что накопление Zn и Cd в гепатопанкреасе в 2 раза выше, чем в стопе улитки. Тем самым, целесообразнее использовать гепатопанкреас в качестве биоиндикатора [54].

Долгое время учеными проводились исследования по изучению матричных металлопротеиназ млекопитающих. Известно, что эти ферменты играют важную роль в динамике внеклеточного матрикса, клеточной дифференциации, развитии тканей, заживлении ран и т.д. [51]. Поскольку металлопротеиназы имеют специфическую функцию в регенерации тканей и большого объема клеток, то представляется интерес в изучении ферментов, подобных металлопротеиназам млекопитающих, в сильно регенерирующей ткани гепатопанкреаса улитки *Achatina fulica*. Также гепатопанкреас наземной улитки *A. fulica* является хорошим источником протеолитических ферментов с высокой удельной активностью. Проведенные исследования фермента улитки выявили способность фермента в расщеплении коллагенового субстрата телятины в растворе. Это поведение соответствует поведению металлопротеиназ позвоночных. Фермент коллагеназа, выделенный из печени улитки, характеризуется своей протеолитической активностью, расщепляя пептидные связи в коллагене, и иммунологическими свойствами [42].

Еще один фермент, ДНКазы А, был выделен и очищен из гепатопанкреаса улитки *A. fulica* с помощью серии этапов: экстракции

ацетонным буфером, осаждением сульфатом аммония, колоночной хроматографией на гидроксилпатите, фосфоцеллюлозе, сине-сефарозе и поли(А)-сефарозе.

При выделении и очистке ДНКазы А обнаружилось две ее изоформы: ДНКазы А1 и ДНКазы А2. ДНКазы А1 менее стабильна и содержится в меньших количествах, в отличие от ДНКазы А2. В связи с чем ДНКазы А2 подвергалась большим исследованиям, соответственно более изучена. ДНКазы А2 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 30000, который состоит из 3 субъединиц с молекулярной массой 17500, 8000 и 4800. Эти субъединицы соединены дисульфидными связями. По отдельности субъединицы не обладают ДНКазной активностью. Из чего можно сделать вывод, что межцепочечные связи необходимы для поддержания конформации. После разделения субъединиц на колоночной хроматографии, они легко объединяются и возвращаются в исходное положение.

Биологической ролью ДНКазы А может быть инактивация олиго(dA)- и олиго(dT)-доменов ДНК, поскольку фермент продуцирует разрывы нитей, которые не могут быть восстановлены полинуклеотидными лигазами. [79].

Брюхоногие моллюски очень зависимы от влияния окружающей среды. Попадая в неблагоприятные условия, улитки впадают в спячку, спрятав свое тело в раковину. Такими неблагоприятными условиями могут служить суточные колебания температур и влажности, а также сезонные изменения. Исходя из этого, улитки имеют циклы спячка/бодрствование, которые влияют на биохимический состав органов и тканей наземных моллюсков. Перепады температур и влажности оказывают воздействие на антиоксидантную систему, а, следовательно, и на ферментативную активность. В составе органов увеличивается или уменьшается активность ферментов, отвечающих за функционирование того или иного органа или ткани. Так, стало известно, что у наземных моллюсков высокая активность каталазы в гепатопанкреасе во время цикла спячка/бодрствование может быть связана с постоянной защитой от цитотоксической активности H_2O_2 .

Также исследования показали, что активность селен-зависимой глутатионпероксидазы в гепатопанкреасе повышается как в теплое, так и холодное время года. Ученые сделали вывод, что селен-зависимая глутатионпероксидаза значительно улучшает способность улиток детоксифицировать H_2O_2 или органические пероксиды, которые могли бы стимулировать посредством реакции Фентона перекисное окисление липидов и окислительный стресс [40,55].

Таким образом, проанализировав литературу, выяснилось, что как таковых исследований по общему белковому и пептидному составу печени брюхоногих моллюсков не было произведено. Более всего изучены ферменты металлопротеиназы, которые отвечают за реакцию организма на загрязнение окружающей среды, и ферментов, участвующих в защите от цитотоксической активности перекиси водорода либо от окислительного стресса в периоды спячка/бодрствование. Исходя из этого, для получения полной картины белкового и пептидного состава печени улиток была поставлена цель - выделить и изучить белки и пептиды гепатопанкреаса брюхоногих моллюсков.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материал исследования

В качестве объекта для исследования были выбраны представители двух семейств: *Achatinidae* и *Helicidae*. *Achatina fulica*, или ахатина гигантская, была одомашнена, ее рацион питания составляли: кабачки, огурцы, яблоки и пекинская капуста, в качестве минеральной добавки использовали кормовой мел для попугаев. *Helix pomatia*, или виноградная улитка, была взята с территории родников, вблизи от проезжей части и жилых домов. В ее рацион питания входит местная растительность: листья подорожника, одуванчик, крапива, клевер.

Материалом исследования послужил гепатопанкреас улиток. Вскрытие моллюска происходило следующим образом: разбивали раковину, освобождали тело, вдоль спирально закрученного тела делался разрез, печень освобождали от мантийной полости и тщательно промывали дистиллированной водой. Для исследования потребовался 10% гомогенат печени. Чтобы получить гомогенат, навеску ткани массой 1г гомогенизировали в 10 мл дистиллированной воды. Далее получившуюся смесь центрифугировали в течение 10 минут при 4000 g. Осадок отбрасывали, а супернатант использовали для дальнейшего определения белкового и пептидного состава.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Определение содержания белковых веществ методом Лоури

Для определения содержания общей концентрации белковых веществ в слизи улиток использовали метод Лоури, как наиболее достоверный, и один из наиболее простых и быстрых в использовании.

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10 - 100 мкг белка в пробе). Интенсивность окраски комплекса, которая пропорциональна количеству белка в исследуемой пробе, измерялась при длине волны с максимумом поглощения 750 нм, на фотоэлектроколориметре КФК-3 в кюветах с длиной оптического пути 10мм.

2.2.2 Метод гель-фильтрации

Гель-фильтрация (синоним гель-хроматография) - метод разделения смеси веществ с различными молекулярными массами путем фильтрации через различные так называемые ячеистые гели. Гель-фильтрация широко используется для определения величин молекулярных масс, обессоливания растворов нативных белков, концентрирования растворов полимеров.

Гель-фильтрацию проводят на хроматографических колонках, заполненных набухшим гранулированным гелем, например, гелем сефадексов (коммерческое название полисахаридов декстранов, прошедших специальную химическую обработку, в результате которой между линейными структурами их молекул образуется множество поперечных связей, или «сшивок»), биогелем и т.п., элюируют (вымывают) разделяемые вещества разбавленными солевыми или буферными растворами.

Эффективность гель-фильтрации определяется размерами пор между гранулами геля и величиной ячеек каждой гранулы: мелкие молекулы вещества (значительно меньше ячейки геля) диффундируют внутрь гранулы и задерживаются при фильтрации через эти своеобразные молекулярные сита, а более крупные молекулы не могут попасть в ячейки и проходят в поры между гранулами.

Способность молекул анализируемого соединения проникать в растворитель, поглощенный частицами набухшего геля, зависит от степени пористости частиц геля и от размера молекул соединения. Распределение

вещества на колонке, заполненной набухшим гелем, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи частиц геля.

Подготовка колонки для гель-фильтрации.

Подготовка геля: Сефадекс G-25 суспендировали в 5-10 кратном объеме дистиллированной воды и оставляли для набухания на 3 часа. Затем перемешивали, давали отстояться. После оседания основной массы геля осторожно декантировали надосадочную жидкость с неосевшими обломками гранул. Суспендирование и последующую декантацию повторяли 3-4 раза, т. к. отмучивание геля уменьшает сопротивление колонки потоку растворителя, что приводит к увеличению скорости элюции.

Заполнение колонки: Колонку закрепили в вертикальном положении, закрыли нижний конец пробкой со вставленным фитингом, поместили в основание колонки кружок фильтровальной бумаги. Залили 2 мл дистиллированной воды, дали заполниться фитингу и через воронку по стенке заливали густую суспензию геля. Открыли зажим колонки и дали раствору свободно вытекать, следя за тем, чтобы столбик геля находился над слоем раствора. Суспензию геля прибавляли до тех пор, пока его высота в колонке не достигла нужного уровня. Затем на поверхность геля поместили кружок фильтровальной бумаги. Колонку промыли (уравновесили) 1 объемом дистиллированной воды.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для построения калибровочного графика по концентрации белков и пептидов методом Лоури в качестве калибровочного вещества был использован бычий сывороточный альбумин (таблица 1 и 2).

Таблица 2 – Данные для построения калибровочного графика по бычьему сывороточному альбумину

№ пробы	Содержание БСА, мкг/мл	Оптическая плотность, D					Опыт-Контроль
		1	2	3	4	сред.	
1	10	0,032	0,03	0,03	0,026	0,029	0,016
2	20	0,045	0,04	0,037	0,035	0,039	0,026
3	30	0,05	0,048	0,039	0,036	0,043	0,03
4	40	0,068	0,06	0,054	0,057	0,059	0,046
5	50	0,069	0,066	0,073	0,068	0,069	0,056
6	60	0,066	0,075	0,082	0,083	0,076	0,063
7	70	0,099	0,091	0,085	0,083	0,089	0,076
8	80	0,096	0,096	0,096	0,103	0,097	0,084
9	90	0,097	0,099	0,106	0,105	0,101	0,088
10	100	0,115	0,115	0,107	0,114	0,112	0,099
Конт	0	0,012	0,013	0,014	0,013	0,013	

Таблица 3 – Данные для построения калибровочного графика по бычьему сывороточному альбумину

№ пробы	Содержание БСА, мкг/мл	Оптическая плотность, D					Опыт-Контроль
		1	2	3	4	среднее	
1	10	0,03	0,026	0,025	0,029	0,028	0,015
2	20	0,043	0,041	0,036	0,037	0,039	0,026

Продолжение таблицы 3

№ пробы	Содержание БСА, мкг/мл	Оптическая плотность, D					Опыт-Контроль
		1	2	3	4	среднее	
3	30	0,046	0,052	0,048	0,052	0,05	0,037
4	40	0,056	0,062	0,054	0,058	0,058	0,045
5	50	0,071	0,071	0,073	0,071	0,072	0,059
6	60	0,083	0,075	0,09	0,078	0,082	0,069
7	70	0,087	0,089	0,087	0,091	0,089	0,076
8	80	0,092	0,102	0,106	0,102	0,101	0,088
9	90	0,091	0,110	0,095	0,119	0,104	0,091
10	100	0,114	0,119	0,115	0,112	0,115	0,102
Конт	0	0,012	0,013	0,014	0,013	0,013	

Окончание таблицы 3

Калибровочные графики имеют следующий вид, представленный на рисунке 1

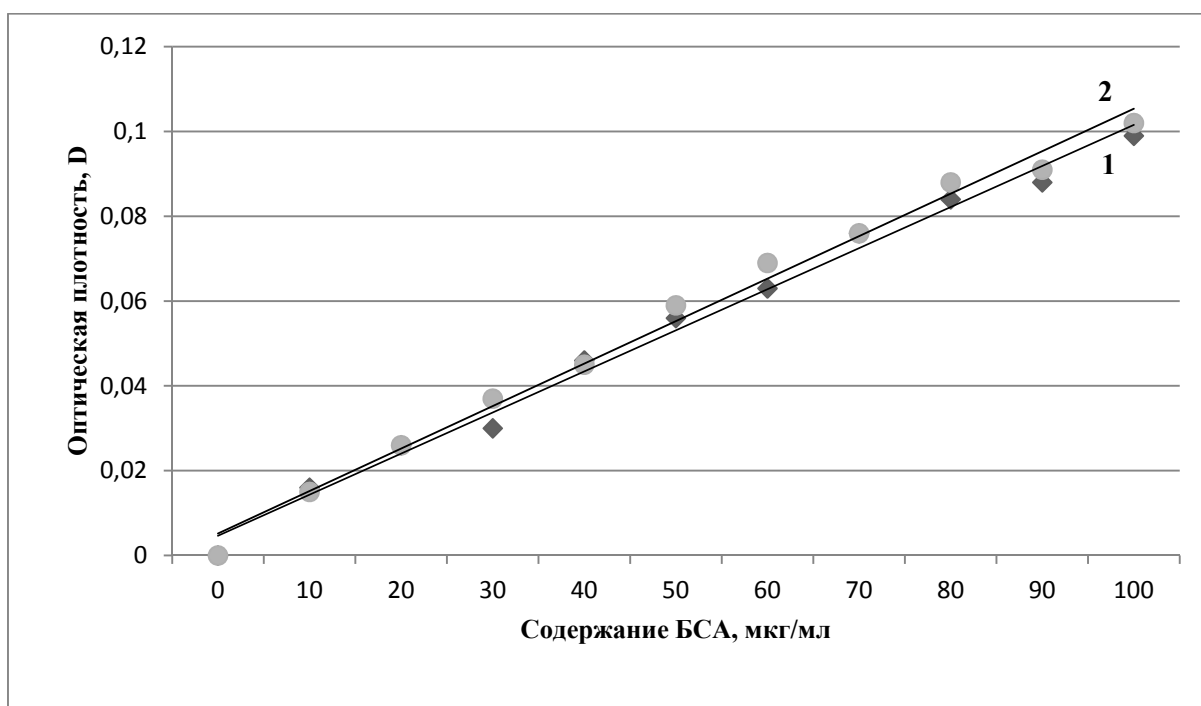


Рисунок 1. Линейные прямые калибровочных графиков по бычьему сывороточному альбумину.

Линейное уравнение для калибровочного графика типа $y=ax+b$ имеет следующий вид:

$$Y(x) = 0,0010018 x + 0,0051818. \quad (1)$$

Осуществив пересчет коэффициента из оптической плотности и содержанию белка, получили следующие значения (таблица 4):

Таблица 4 – Пересчет коэффициента

Содержание белка, мг/мл	Коэффициент, К	
	Опыт 1	Опыт 2
0,01	0,625	0,666
0,02	0,769	0,769
0,03	1	0,811
0,04	0,869	0,888
0,05	0,893	0,847
0,06	0,952	0,869
0,07	0,921	0,921
0,08	0,952	0,909
0,09	1,023	0,989
0,1	1,010	0,980
Среднее значение	0,901	0,865

Определение свободного и внутреннего объёмов колонки и калибровка колонки проводились следующим образом.

Через колонку пропускали раствор голубого декстрана объёмом 0,5 мл, а также растворы цитохрома С, БОК-КБЗ-L-лизина и рибофлавина того же объёма концентрацией в 1мг/мл, собирали фракции объёмом 1 мл. В качестве элюирующего раствора использовали дистиллированную воду. Затем измеряли величину оптической плотности полученных фракций при 750 нм для голубого декстрана, при 440 нм - для рибофлавина, для цитохрома С и БОК-КБЗ-L-лизина определяли оптическую плотность, после проведения метода Лоури, при 750нм на КФК-3. Полученные данные приведены в таблице 5. По результатам, представленным в таблице, были построены графики элюции, которые отображены на рисунках 2,3, 4 и 5.

Складывая объёмы всех фракций, вышедших до максимума поглощения при 750 нм с декстраном, нашли свободный объём колонки, который составил 5 мл. Внутренний объём колонки вычислили как разность между объёмом элюции рибофлавина и свободным объёмом по формуле 2:

$$V_{\text{внутр.}} = V_{\text{эл(рибофл)}} - V_{\text{своб.}} \quad (2)$$

Таблица 5 – Определение рабочего объема колонки

$\lambda=750 \text{ нм}$	
1	0,004
2	0,008
3	0,008
4	0,019
5	0,021
6	0,012
7	0,009
8	0,009
9	0,004

Продолжение таблицы 5

$\lambda=440$ нм	
10	0,002
11	0,002
12	0,004
13	0,025
14	0,048
15	0,029
16	0,024
17	0,022
18	0,020
19	0,014
20	0,009
21	0,004
22	0,002

Окончание таблицы 5

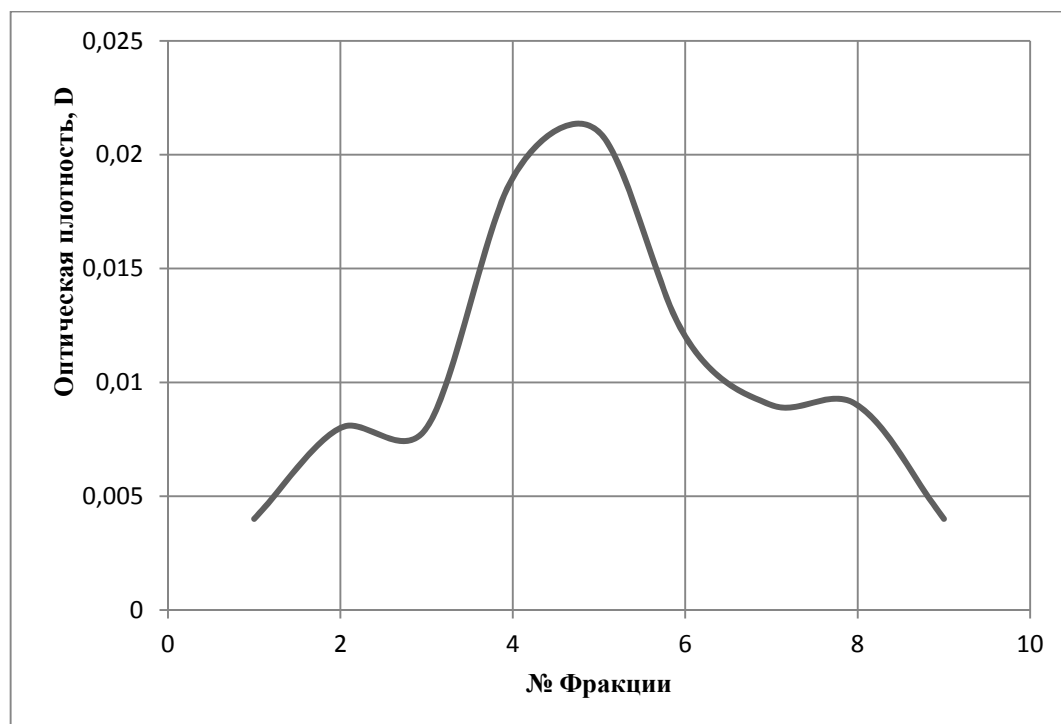


Рисунок 2. Профиль элюции раствора голубого декстрана

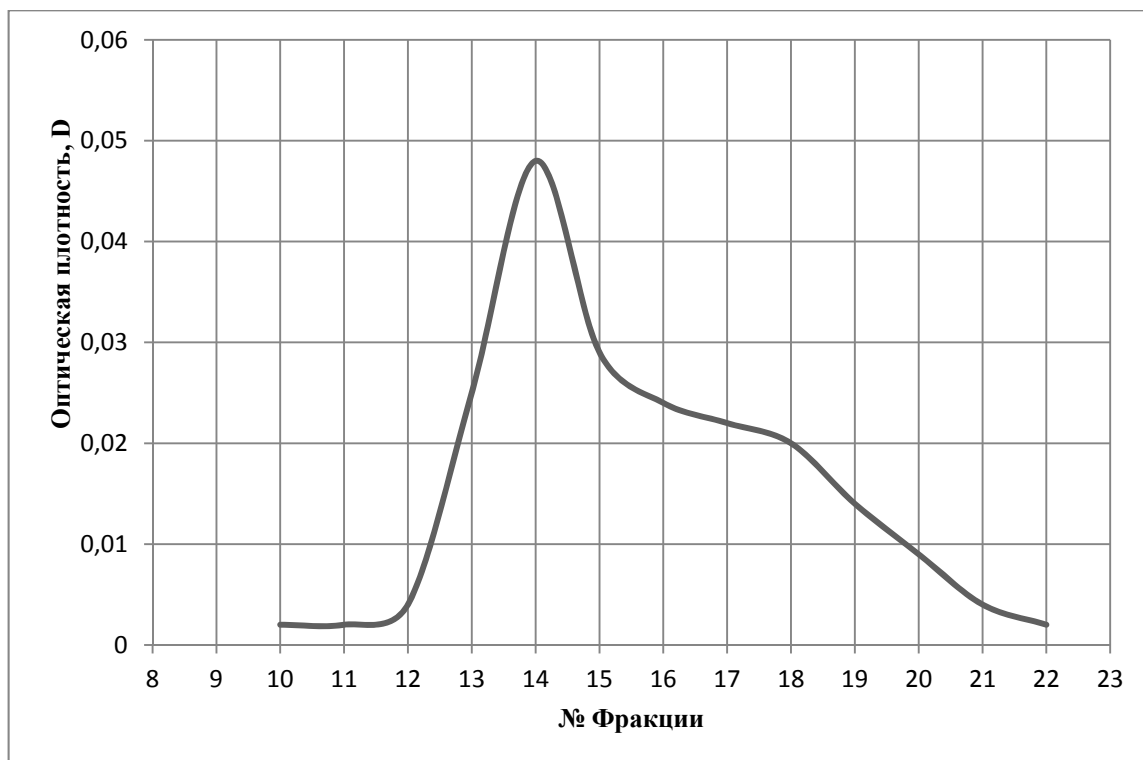


Рисунок 3. Профиль элюции раствора рибофлавина

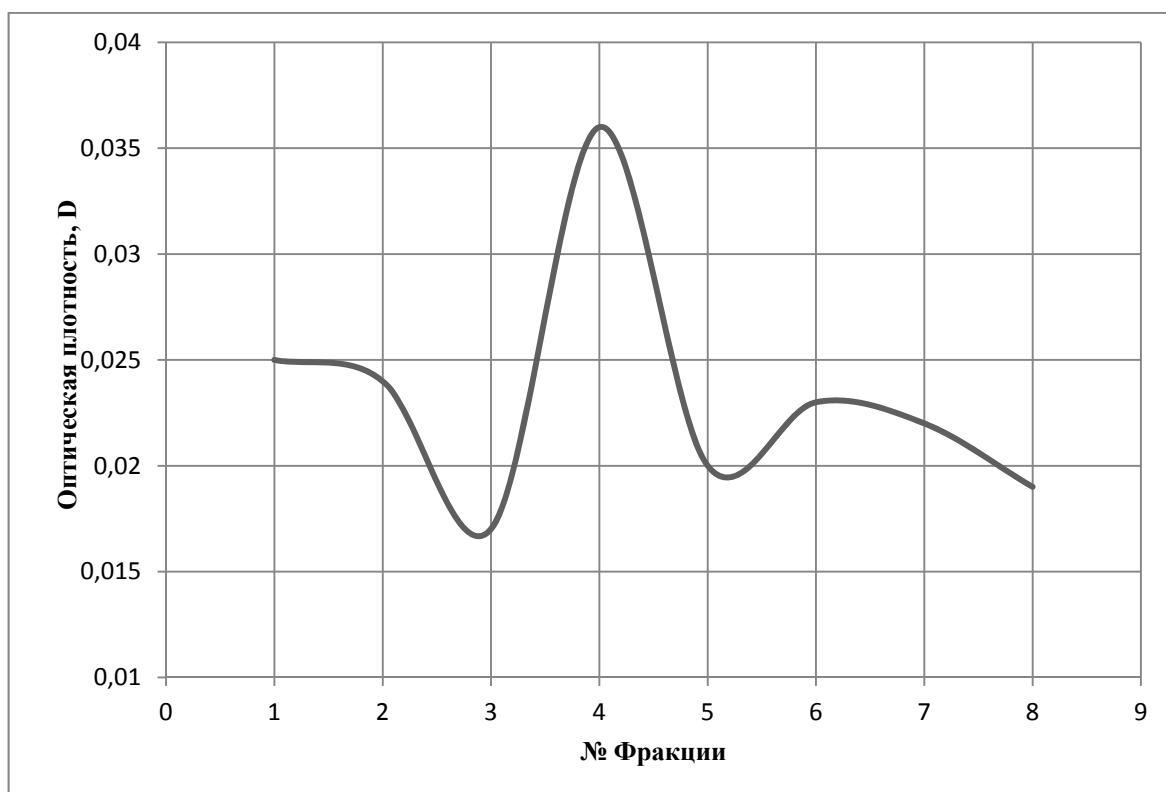


Рисунок 4. Профиль элюции раствора цитохрома С

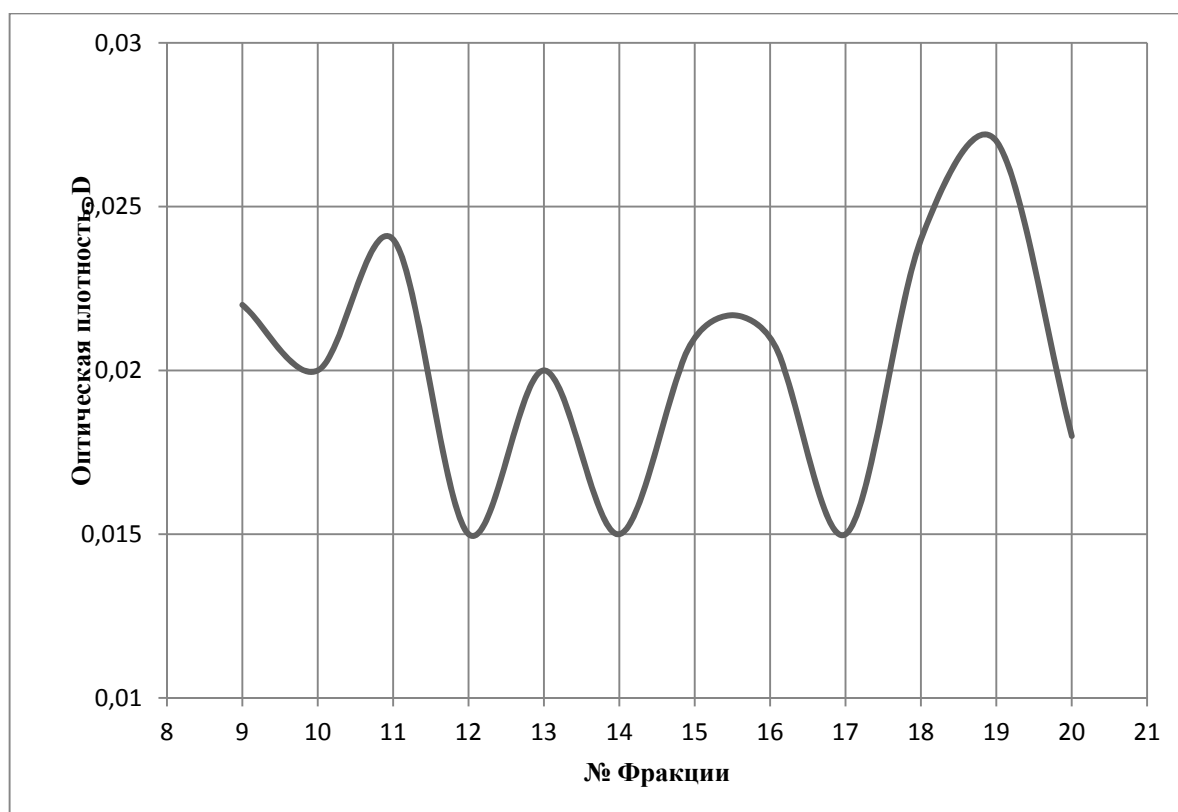


Рисунок 5. Профиль элюции раствора БОК-КБЗ-Л-лизина

Для каждого из маркеров рассчитали коэффициент распределения по формуле 3:

$$K_{av} = (V_{эл}(белка) - V_{своб.}) / V_{внутр.} \quad (3)$$

По результатам калибровки колонки, используя метод наименьших квадратов, получили уравнение прямой, которая отображает зависимость коэффициента распределения от логарифма молекулярной массы исследуемого вещества.

Для этого нами первоначально была составлена таблица 6, которая содержит все необходимые параметры для нахождения коэффициентов а и b в уравнении $K_{av} = a \lg M + b$.

Таблица 6 – Параметры для последующего решения системы уравнений

Маркер	Vэл	Kav	M, Да	lgM	(lgM) ²	Kav*lgM
Цитохром С	4	0,041	12300	4,090	16,727	0,168
БОК-КБЗ- L-лизин	11	0,222	561,85	2,750	7,560	1,456
Рибофлавин	14	1,000	376,37	2,576	6,634	2,576
Σ		1,571		9,415	30,922	4,200

Используя значения таблицы 6, составили систему уравнений:

$$\begin{cases} 30,922a + 9,415b = 4,200 \\ 9,415a + 3b = 1,571 \end{cases}$$

Решив данную систему, определили параметры а и b: а = -0.531, b = 2.191. Путём простых математических вычислений мы получили формулу 4 для расчета молекулярной массы при известном объёме элюции:

$$M = 105,123 - V_{эл} 9,027 \quad (4)$$

Пептидный профиль элюции гепатопанкреаса улитки *A. fulica* до кипячения, на котором отчетливо виден пик (рисунок 6):

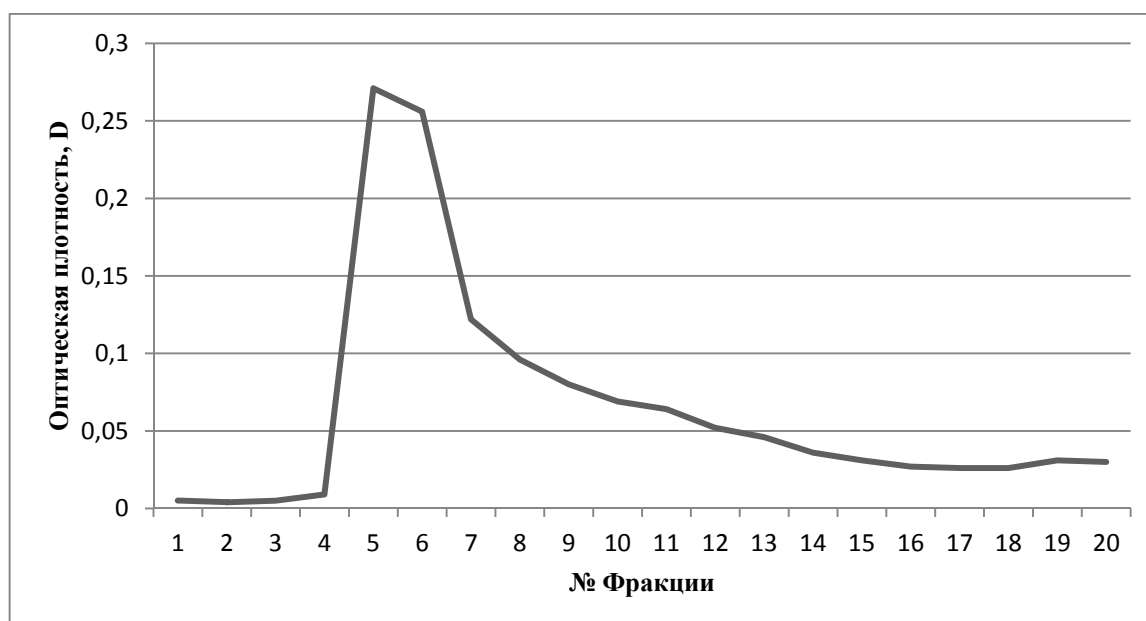


Рисунок 6. Профиль элюции пептидов гепатопанкреаса улитки *A. fulica* до кипячения

Далее гомогенат гепатопанкреаса улитки *A. fulica* подвергли кипячению в течение 10 минут, после чего центрифугировали и отбрасывали осадок. Проведя разделение пептидов методом гель-фильтрации, получили пептидный профиль элюции, который изображен на рисунке 7.

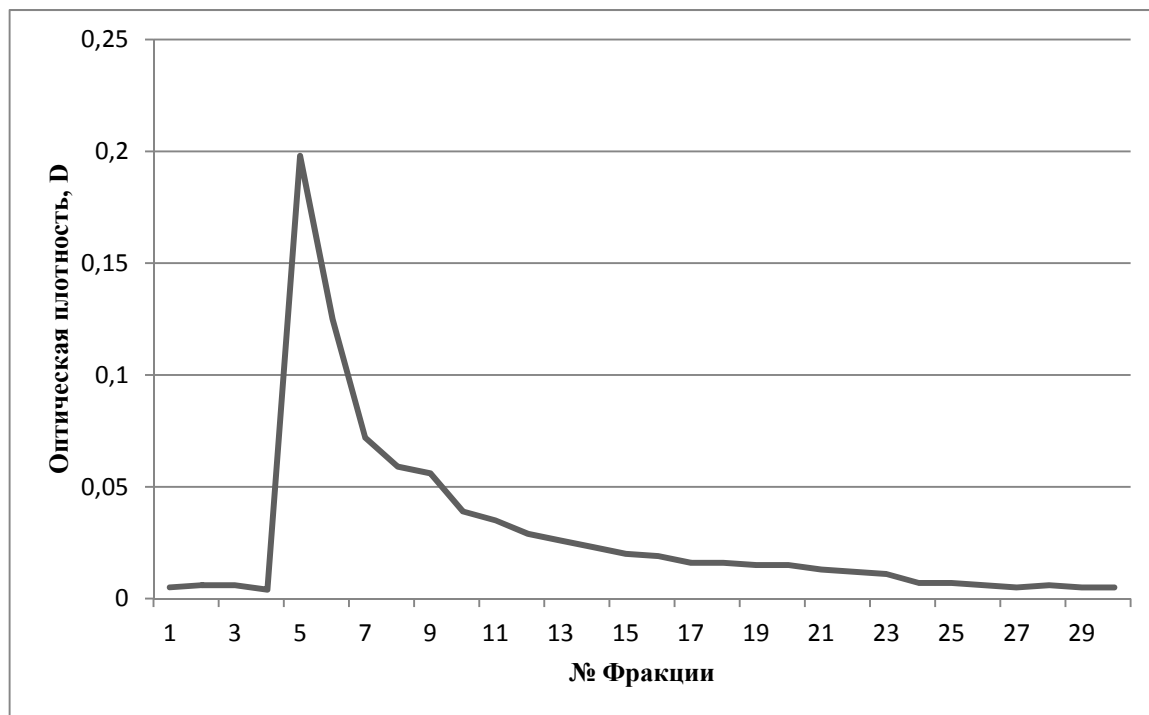


Рисунок 7. Профиль элюции пептидов гепатопанкреаса улитки *A. fulica* после кипячения

По профилям элюции, изображенных на рисунках 6 и 7, можно отчетливо увидеть один пик, который говорит о том, что либо в биохимическом составе гепатопанкреаса улитки имеются только высокомолекулярные белки, выходящие в свободном объеме колонки, либо данный метод гель-фильтрации не подходит для разделения белков и пептидов печени улитки.

С помощью уравнения прямой 1 калибровочного графика по бычьему сывороточному альбумину рассчитали концентрацию белков и пептидов до и после кипячения в гомогенате печени улитки *A. fulica* (таблица 7).

Таблица 7 – Расчеты концентрации белков и пептидов в гомогенате печени улитки *A. fulica*

№ Опыта	Концентрация, С		С белков/С пептидов
	белков, мкг/мл	пептидов, мкг/мл	
1	260	152	1,7
2	415	179	2,3
3	384	181	2,1
4	240	99	2,4
5	237	104	2,3
6	244	128	1,9
7	283	117	2,4
8	268	120	2,2
9	317	141	2,3
10	322	144	2,2
11	327	144	2,3
12	317	143	2,2
Среднее значение	302	138	2,2

По данным приведенным в таблице 7 видно, что удаленные кипячением белки составляют половину от всего объема белковой составляющей гепатопанкреаса улитки.

Следующим этапом эксперимента послужило исследование белкового и пептидного состава гепатопанкреаса улитки *H. pomatia* для проведения сравнительной характеристики. Для осуществления данной задачи методом гель-фильтрации провели разделения белков и пептидов гомогената печени улитки *H. pomatia* до кипячения. Профиль элюции представлен на рисунке 8.

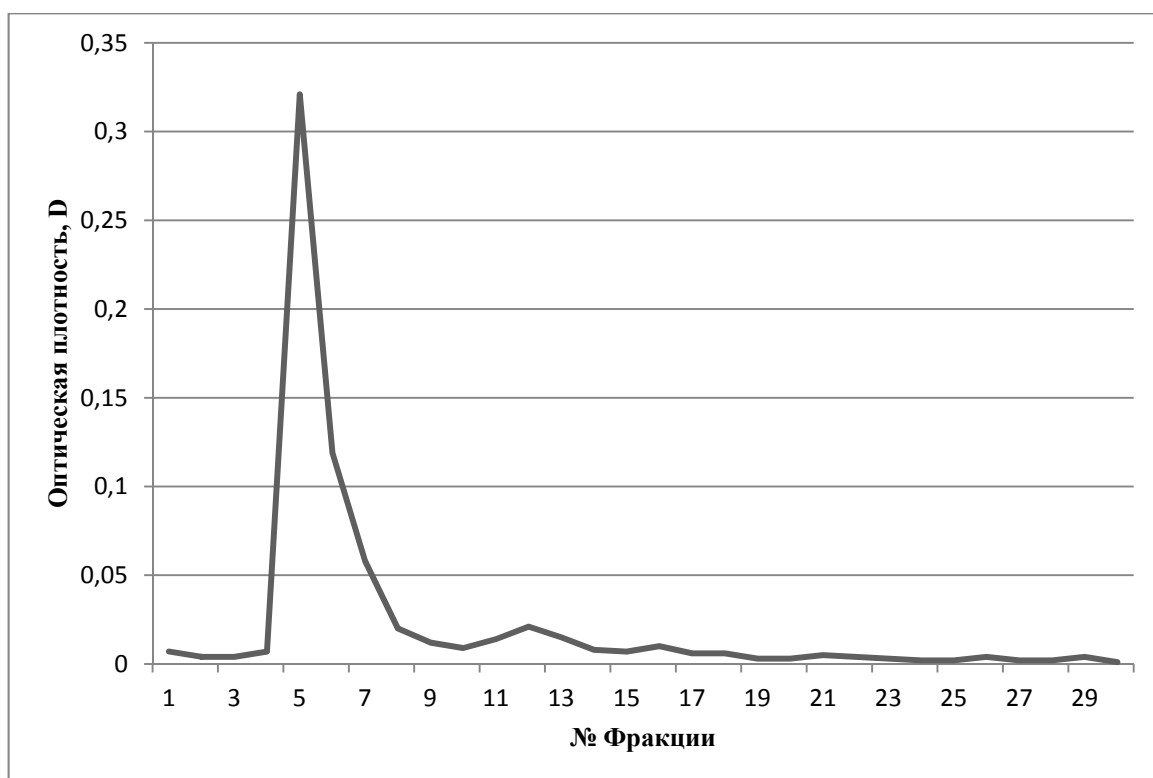


*Рисунок 8. Профиль элюции пептидов гепатопанкреаса улитки *H. pomatia* до кипячения*

На рисунке 8 отчетливо виден один пик белков, выходящих в свободном объеме колонки.

Далее гомогенат печени улитки *H. pomatia* подвергли кипячению в течение 10 минут, после чего центрифугировали аналогично тому, как проводили данную обработку с гомогенатом печени улитки *A. fulica*. Профиль элюции представлен на рисунке 9.

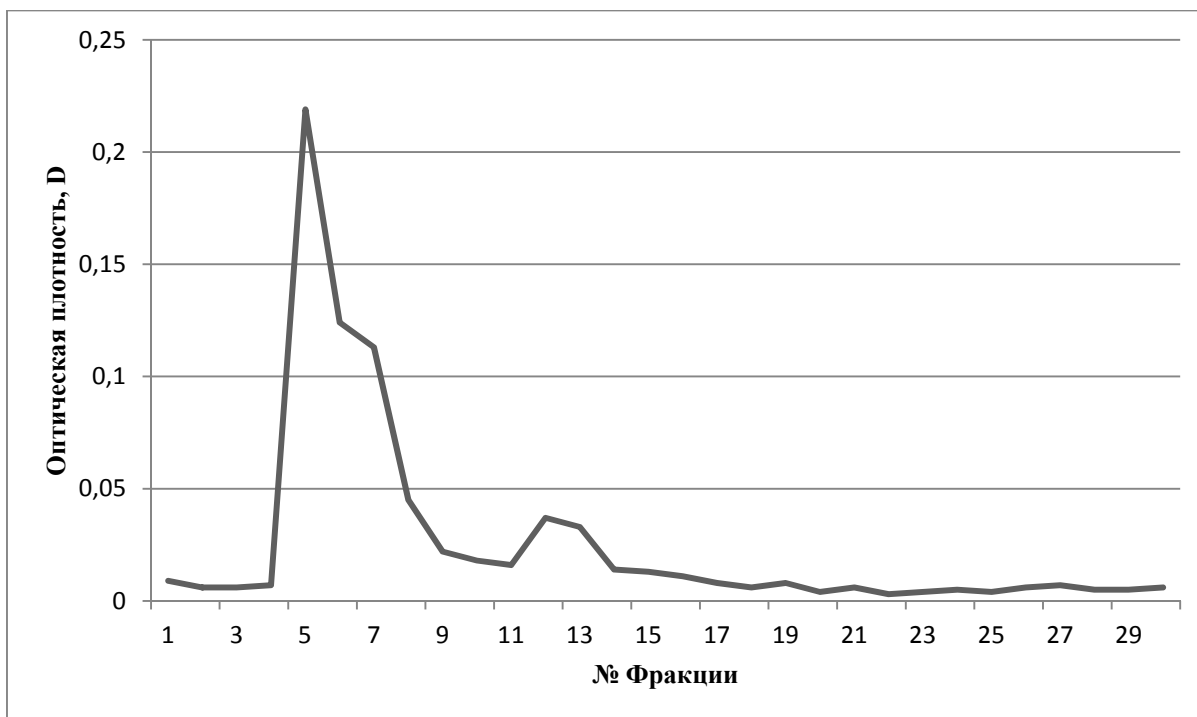


Рисунок 9. Профиль элюции пептидов гепатопанкреаса улитки *H. pomatia* после кипячения

Разделение белков от пептидов в гомогенате печени улитки *H. pomatia* также как и у *A. fulica* оказалось невозможным. В данном случае можно сделать предположения о наличии в гепатопанкреасе улитки высокомолекулярных белков или данный метод не подходит как таковой для разделения.

По уравнению прямой 1 калибровочного графика по БСА рассчитали концентрацию белков и пептидов до и после кипячения гомогената печени улитки *H. pomatia* (таблица 8).

Таблица 8 – Расчеты концентрации белков и пептидов в гомогенате печени улитки *H. pomatia*

№ Опыта	Концентрация, С		С белков/С пептидов
	белков, мкг/мл	пептидов, мкг/мл	
1	309	208	1,5
2	324	211	1,5
3	294	217	1,4
4	298	207	1,4
5	304	197	1,5
6	303	212	1,4
7	302	213	1,4
8	227	157	1,4
9	221	151	1,5
10	221	160	1,4
11	224	166	1,3
12	223	165	1,4
Среднее значение	245	189	1,4

В ходе эксперимента проверке на наличие белков и пептидов подверглась белковая железа улиток двух семейств, выбранных в качестве объектов исследования. Результаты получившихся концентраций представлены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 – Расчеты концентрации белков и пептидов в гомогенате
белковой железы улитки *A. fulica*

№ Опыта	Концентрация, С		С белков/С пептидов
	белков, мкг/мл	пептидов, мкг/мл	
1	440	460	≈ 1
2	418	455	≈ 1
3	428	462	≈ 1
4	438	460	≈ 1
5	438	461	≈ 1
6	404	430	≈ 1
7	392	440	≈ 1
8	389	444	≈ 1
9	389	441	≈ 1
10	393	440	≈ 1
11	405	439	≈ 1
12	415	455	≈ 1
Среднее значение	412	449	≈ 1

Таблица 10 – Расчеты концентрации белков и пептидов в гомогенате
белковой железы улитки *H. rotatia*

№ Опыта	Концентрация, С		С белков/С пептидов
	белков, мкг/мл	пептидов, мкг/мл	
1	345	385	≈ 1
2	330	371	≈ 1

Продолжение таблицы 10

№ Опыта	Концентрация, С		С белков/С пептидов
	белков, мкг/мл	пептидов, мкг/мл	
3	329	351	≈ 1
4	341	355	≈ 1
5	373	401	≈ 1
6	366	359	≈ 1
7	341	352	≈ 1
8	339	360	≈ 1
9	360	358	≈ 1
10	345	358	≈ 1
11	334	350	≈ 1
12	343	385	≈ 1
Среднее значение	346	365	≈ 1

Окончание таблицы 10

Как видно из результатов, приведенных в таблицах 9 и 10, содержание белков и пептидов до и после кипячения в гомогенате белковой железы практически не изменяются, или в кипяченных пробах концентрация увеличивается.

Изучение белкового и пептидного состава того или иного биологического объекта имеет большое значение для науки. К настоящему времени охарактеризовано огромное количество пептидов практически у всех групп животных и отмечено большое разнообразие физиологических эффектов, которые оказывают данные пептиды.

Большая группа физиологически активных пептидов со сходными молекулярными массами представляет собой группу опиоидных пептидов.

Большинство опиоидных пептидов образуется из общих белковых предшественников (проопиомеланокортин, продинорфины и др.), из которых в результате последовательного протеолитического процессинга образуются физиологически активные молекулы. Выделяется роль опиоидных пептидов в физиологических процессах, связанных с высшей нервной деятельностью – регуляция многообразных поведенческих реакций: агрессивное поведение, мотивация удовлетворения, половое влечение, пищевое насыщение, стрессорные адаптивные процессы, лекарственная зависимость, модуляция болевой чувствительности и др. Значительно участие опиоидных пептидов в нейродегенеративных процессах, а также в ишемических и травматических повреждениях мозга. Существенна роль эндогенных опиоидов в регуляции кардиоваскулярной и респираторной активности. Контроль центральных и периферических функций организма осуществляется, как правило, при соучастии опиоидных пептидов с другими пептидами и/или низкомолекулярными медиаторами.

Целью данной работы послужило изучение белкового и пептидного состава гепатопанкреаса наземных улиток, ранее не упоминавшемся в научной литературе.

В качестве объекта исследования были выбраны представители брюхоногих моллюсков двух разных семейств *Achatinidae* и *Helicidae*. *Achatina fulica*, или ахатина гигантская, была одомашнена, ее рацион питания составляли: кабачки, огурцы, яблоки и пекинская капуста, в качестве минеральной добавки использовали кормовой мел для попугаев. *Helix pomatia*, или виноградная улитка, была взята с территории родников, вблизи от проезжей части и жилых домов. В ее рацион питания входит местная растительность: листья подорожника, одуванчик, крапива, клевер. Предметом исследования послужила печень улитки и белковая железа. Для проведения работы были выбраны классические методы исследования белков и пептидов: метод гель-фильтрации, удаление высокомолекулярных пептидов кипячением и центрифугированием.

В начале эксперимента исследованию подвергся гепатопанкреас улитки *A. fulica*. Предварительно у взрослой улитки изымали печень, после чего из нее делали гомогенат, с которым, в дальнейшем, проходила работа. В исследуемых образцах до и после кипячения по методу Лоури был определен общий белковый и пептидный состав. Проведя обработку результатов, выяснилось, что после кипячения содержание белков и пептидов уменьшилось в 2,2 раза. Исходя из этих данных, было сделано предположение о наличии пептидной составляющей гепатопанкреаса улитки *A. fulica*. Чтобы разделить белки от пептидов по размеру и молекулярной массе, гомогенаты печени улитки до и после кипячения пропустили через установку для гель-фильтрации. В получившихся фракциях определили содержание белков и пептидов, по результатам построили профили элюции. В полученных графиках было отчетливо видно, что предполагаемые пептиды выходят в свободном объеме колонки. Из чего можно сделать следующие предположения: либо содержащиеся в печени улитки белки могут быть термостабильными, поэтому их невозможно удалить простым кипячением; либо классические методы разделения белков не пригодны для данного исследования.

Для проведения сравнительной характеристики белков и пептидов улиток разных семейств, в качестве второго объекта исследования была выбрана улитка *H. pomatia*, обитающая в дикой среде. Гепатопанкреас данной улитки прошел такие же процедуры обработки, что и с гепатопанкреасом улитки *A. fulica*. Полученные результаты по общему белковому и пептидному составу печени немного отличались у выбранных объектов исследования. После кипячения гомогената печени улитки *H. pomatia* содержание белков и пептидов уменьшилось в 1,4 раза. Общее содержание белков и пептидов в печени улитки *A. fulica* оказалось больше, чем у улитки *H. pomatia*, что может говорить об особенностях видов или семейств в целом, различаем условий обитания и воздействия окружающей среды. Что касается разделения белков от пептидов в гомогенате печени

улитки *H. pomatia* методом гель-фильтрации, то здесь тоже имеет смысл сделать предположение о наличии в гепатопанкреасе улитки термостабильных белков или неподходящем выборе метода для исследования.

В ходе эксперимента исследованию белкового и пептидного состава подверглась белковая железа выбранных нами представителей наземных моллюсков разных семейств. Белковая железа входит в систему органов размножения. Она обволакивает оплодотворенное яйцо слизистым веществом, чтобы обеспечить яйцу питание и защиту. К настоящему времени нет четких представлений о белковой и пептидной составляющей белковой железы, следовательно, наряду с гепатопанкреасом белковая железа представляет большой интерес в исследовании содержания белков и пептидов.

У взрослой половозрелой улитки была изъята белковая железа, после чего из нее делали гомогенат, с которым, в дальнейшем, проходила работа. В исследуемых образцах до и после кипячения по методу Лоури был определен общий белковый и пептидный состав. Получившиеся результаты оказались неоднозначными, так как в прокипяченной пробе содержание белка оказалось больше. Из проделанной работы можно сделать вывод, что классический метод кипячения для удаления высокомолекулярных белков не подходит.

Проанализировав результаты по проделанной работе можно сделать предположение, что в состав гепатопанкреаса и белковой железы брюхоногих моллюсков входят термостабильные белки, которые трудно удалить из раствора обычным кипячением и центрифугированием.

Известно, что термостабильность белков объясняется способностью сохранять пространственную структуру полипептидной цепи под действием высоких температур. Одним из основных факторов стабильности является особенность первичной структуры термостабильных белков. В фундаментальных исследованиях термостабильные белки часто

используются в процессе биологического анализа, например в качестве биосенсеров. На наземные моллюски часто оказывает влияние окружающая среда, они живут в условиях постоянно меняющихся температур. Можно предположить, что в гепатопанкреасе и белковой железе присутствуют белки теплового шока, которые являются защитой организма от последствий воздействия резких перепадов температур. Данные белки, называемые также стрессорными, синтезируются в клетках в ответ на тепловой шок и другие негативные воздействия.

Полученные нами результаты можно также объяснить наличием в печени и белковой железе сложных белковых молекул, которыми могут быть глико- и липопротеиды. Давние исследования доказали наличие в гемолимфе моллюсков гемоцианинов, которые представляют собой олигомерные медьсодержащие гликопротеины, функционирующие как носители кислорода в гемолимфе моллюсков и членистоногих. Также в литературе указано на наличие протеогликанов в мягких тканях, слизистой железе, яйцеводе и стопе брюхоногих моллюсков, выполняющих различные функции.

Перспектива в поиске новых источников природных пептидов очень велика. Разрабатываются всё новые методы химического синтеза пептидных молекул для дальнейшего введения пептидных препаратов в производство.

На данный момент имеет большой интерес в изучении белкового и пептидного состава различных биологических объектов не только для получения новых фармакологических препаратов, перспективных для медицины, но и получения систематического представления о белках и пептидах с эволюционной точки зрения.

Таким образом, проведенные нами эксперименты дают основу для дальнейшего исследования белкового и пептидного состава гепатопанкреаса и белковой железы брюхоногих моллюсков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Печень улиток является хорошим биологическим объектом для исследования. Она относится к органам пищеварения, но в отличие от печени позвоночных животных выполняет функцию не только печени, но и других пищеварительных желез, также участвуя в выделении продуктов обмена веществ. Белковая железа, не менее интересный объект исследования, учитывая ее значение в системе размножения брюхоногих моллюсков.

В результате проведенной работы были получены неоднозначные результаты, проанализировав которые можно сделать следующие **выводы**:

1. Выбранные классические методы выделения и очистки для исследования белкового и пептидного состава не подходят для данного биологического объекта, по-видимому, из-за особенностей строения данных молекул.

2. По результатам исследования можно предположить, что в гепатопанкреасе и белковой железе брюхоногих моллюсков присутствуют термостабильные белки.

3. В составе гепатопанкреаса и белковой железы брюхоногих моллюсков, вероятно, присутствуют сложные белки, характеризующиеся всходящими в их состав фрагментами углеводов и липидов.

4. Соотношение белков и пептидов в печени улиток одного вида практически всегда одинаковое, при этом присутствует выраженное межвидовое различие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ашмарин, И. П. Нейропептиды / И. П. Ашмарин, Е. П. Каразеева. – в кн. “Нейрохимия” под ред. И. П. Ашмарина, П. В. Стукалова – М.: Издательство института биомедицинской химии РАМН. – 1996. – 296-333 с.
2. Ашмарин, И. П. Нейрохимия в таблицах и схемах / И. П. Ашмарин, Н. Д. Ещенко, Е. П. Каразеева. – М.: Экзамен, 2007. – 144 с.
3. Ашмарин, И. П. Нейропептиды / И. П. Ашмарин, С. В. Королева // Вестник РАМН. – 2002. – №6. – С. 40-48.
4. Ашмарин, И. П. Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов / И. П. Ашмарин // Вопр. мед. Химии. – 1984. – Т. 30, № 3. – С. 2.
5. Ашмарин, И. П. Регуляторные пептиды / И. П. Ашмарин, М. Р. Обухова. – БМЭ, 1988. – Т. 29. – С. 312.
6. Барнс, Р. Беспозвоночные. Новый обобщенный подход / Р. Барнс, П. Кейлоу, П. Олив, Д. Голдинг. – М: Мир, 1992. – 159-160 с.
7. Биохимия межклеточного матрикса / Е. С. Северина. – Учебник для вузов, 2003. – 705 с.
8. Вернигора, А. Н. Механизм регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н – фермента процессинга нейропептидов / А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин // Биохимия. – 1995. – № 12. – С.1491-1497.
9. Вернигора, А. Н. Протеолитические ферменты: субклеточная локализация, свойства и участие в обмене нейропептидов / А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин // Биохимия. – 1996. – № 5. – С. 771-785.
10. Гомазков, О. А. Мозг и нейропептиды / О. А. Гомазков. – Справочно-информационное издание. – М.: ИБМХ, 1997. – 170 с.
11. Гомазков, О. А. Молекулярные механизмы регуляции нейрохимических процессов. История и современный взгляд / О. А. Гомазков // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, №3. – С. 42-54.

12. Гомазков, О. А. Нейропептиды - универсальные регуляторы. Почему? / О. А. Гомазков // Природа. – 1999. – № 4. – С. 28-32.
13. Гомазков, О. А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов / О. А. Гомазков. – М.: Наука, 1993. – С. 160 .
14. Гомазков, О. А. Энзимологические основы физиологического действия регуляторных пептидов / О. А. Гомазков // Биологические науки. – 1986. – № 2. – С. 13-23.
15. Догель, И. А Зоология беспозвоночных / И. А. Догель //. – М.: «Высшая школа», 1981. – С. 442-459.
16. Левицкая, Н. Г. Регуляторные пептиды / Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский // Природа. – 2003. – №10. – С. 57-62.
17. Лихарев, И. М. Наземные моллюски фауны СССР / И. М. Лихарев, Е.С. Раммельмейер. – Издательство академии наук СССР. – 1952. – 11 с.
18. Люсов, В. А. Влияние маточного молочка на течение стенокардии и липидный состав крови больных ИБС / В. А. Люсов, М. В. Мещеряков // Апитерапия сегодня: Тез. докл. III науч.-практ. конф. Рыбное. – 1994. – С. 49-52.
19. Розен, В. Б. Основы эндокринологии / В.Б. Розен – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 9-14 с.
20. Рупперт, Э. Э. Фокс РС, Барнс РД Зоология беспозвоночных. Низшие целомические животные / Э. Э. Рупперт, Р. С. Фокс, Р. Д. Барнс. – М: Академия, 2008. – Т. 2. – 28-99 с.
21. Шуев, Г. Н. Мембранотропная активность регуляторных пептидов / Г. Н. Шуев, Е. Н. Сазанова, И. Г. Яковенко, Е. Ю. Самарина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №1. – С.137-140.
22. Azaryan, A. V. Distinct properties of prohormone thiol protease (Ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H – evidence for Ptp as a novel cysteine protease / A. V. Azaryan , V. Y. H. Hook // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – Vol. 314, № 1. – P. 171-177.

23. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // Nature Reviews Microbiology, 2005. – Vol. 3, № 3. – P. 238-250.
24. Chou, H. Design and synthesis of cationic antimicrobial peptides with improved activity and selectivity against *Vibrio* spp / H. Chou, T. Kuo, J. Chiang, M. Pei, W. Yang, H. Yu, S. Lin, W. Chen // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2008. – Vol. 32, № 2. – P. 130-138.
25. Coaglio, A. L. Identification of a phenoloxidase- and melanin-dependent defence mechanism in *Achatina fulica* infected with *Angiostrongylus vasorum* / A. L. Coaglio, M. A. N. D. Ferreira, W. Dos Santos Lima, C. A. de Jesus Pereira // Parasit Vectors. – 2018. – Vol. 11 № 1. – P. 113.
26. Dallinger, R. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions / R. Dallinger, M. Chabicovsky, B. Lagg, R. Schipflinger, H. G. Weirich, B. Berger // Environ. Toxicol. Chem. – 2004. – Vol. 23, №4. – P. 902-910.
27. Dallinger, R. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes / R. Dallinger, M. Chabicovsky, E. Hödl, C. Prem, P. Hunziker, C. Manzl // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2005. – Vol.289, № 4. – P.1185-1195.
28. Dent, J. Antimicrobial proteins of Snail mucus (*Achatina fulica*) against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* / J. Dent. – Maj // Ked. Gigi. – 2014. – Vol. 47, № 1. – P. 31-36.
29. Domouhtsidou, G. P. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress / G. P. Domouhtsidou, V. K. Dimitriadis // Environmental Pollution. – 2001. – Vol.115, № 1. – P. 123-137.
30. Durr, U. H. N. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides / U. H. N. Durr, U. S. Sudheendra, A. Ramamoorthy //

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – 2006. – Vol. 1758, № 9. – P. 1408-1425.
31. Egg, M. Structural and bioinformatic analysis of the Roman Snail Cd-Metallothionein gene uncovers molecular adaptation towards plasticity in coping with multifarious environmental stress / M. Egg, M. Höckner, A. Brandstätter, D. Schuler, R. Dallinger // Mol. Ecol. – 2009. – Vol.18, № 11. – P. 2426-2443.
 32. E-Kobon, T. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions / T. E-Kobon, P. Thongararm, S. Roytrakul, L. Meesuk, P. Chumnanpuen // Comput Struct Biotechnol J. – 2015. – Vol. 14. – P.49-57.
 33. Gainer, H. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis / H. Gainer, J.T. Russell, Y. P Loh // Neuroendocrinology. – 1985. – Vol. 40, № 1. – P. 171-184.
 34. Gesheva, V. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma / V. Gesheva, S. Chausheva, N. Mihaylova, I. Manoylov, L. Doumanova, K. Idakieva, A. Tchorbanov // BMC Immunol. – 2014. – Vol.15, № 34. – P. 76-81.
 35. Gesteira, T. F., Coulson-Thomas V. J., Ogata F. T., Farias E. M., Cavaleiro R. P., de Lima M.A., Cunha G. L., Nakayasu E.S., Almeida I.C., Toma L., Nader H. B. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Proteins and Proteomics. – 2011. – Vol. 1814, № 12. – P. 1862-1869.
 36. Gomot de Vaufléry, A. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachloro phenol) with *Helix aspersa* / A. Gomot de Vaufléry // Ecotoxicol Environ Saf. – 2000. – Vol. 46. – P. 41-50.
 37. Greco, L., Dynorphin-processing endopeptidase in the rat anterior pituitary lactotrophic cell-line, Gh₄C1 / L. Greco, L. Daly, S. Kim, L. Devi // Neuroendocrinology. – 2002. – Vol. 55, № 3. – P. 351-356.
 38. Harmar, A. J. Neuropeptides / A. J. Harmar // Transm. Mol. In the brain, – 1987. – Vol. 2. – P.17-26.

39. Havens, K. E. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution / K. E. Havens, R. T. James, T. L. East, V. H. Smith // Environmental Pollution. – 2003. – Vol. 122, № 3. – P. 379-390.
40. Hogben, L. Studies on temperature regulation. I. The Pulmonata and Oligochaeta / L. Hogben, R.L. Kirk // Proc. Roy. Soc. Lond.. – 1944. – Vol. 132. – P. 239-252.
41. Hunter, H. N. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis / H. N. Hunter, D. B. Fulton, T. Ganz, H. J. Vogel // J Biol Chem. – 2002. – Vol. 277, № 40. – P. 37597-37603.
42. Indra, D. Isolation, purification and characterization of collagens from hepatopancreas of the land snail *Achatina fulica* / D. Indra, K. Ramalingam, M. Babu // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. – 2005. – V. 142, № 1. – P. 1-7.
43. Jian, Z. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica* / Z. Jian, W. Wenhong, Y. Xiaomei, Y. Xiuwen, L. Rui // Peptides. – 2013. – Vol.39. – P. 1-4.
44. Joo, E. J. Nucleolin: achara sulfate-binding protein on the surface of cancer cells / E. J. Joo, G. B. Dam, T. M. Kuppevelt, T. Toida, R. J. Linhardt, Y. S. Kim // Glycobiology. – 2005. – Vol.15. – P. 1-9.
45. Kowalczyk-Pecka, D. Selected fatty acids as biomarkers of exposure to microdoses of molluscicides in snails *Helix pomatia* (Gastropoda Pulmonata) / D. Kowalczyk-Pecka, S. Pecka, E. Kowalczuk-Vasilev // Environ Pollut. – 2017. – Vol. 222. – P.138-145.
46. Lloyd, M. Exercitatio Anatomia londini / M. Lloyd. – 1994. – Vol. 11. – P. 208.
47. Loh, Y. P. Visualization of peptide secretory vesicles in living nerve cells / Y. P. Loh, J. J. Park // Endocrinol – 2011. – Vol. 210. № 2. – P. 181-187.

48. Lustrino, D. Lipids analysis in hemolymph of African giant *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) exposed to different photoperiods / D. Lustrino, V. M. Tunholi-Alves, V. M. Tunholi, M. P. Marassi, J. Pinheiro // *Braz J Biol.* – 2010. – Vol. 70, №1. – P. 129-134.
49. Matsuzaki, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides / K. Matsuzaki // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes.* – 2008. – Vol. 1788, № 8. – P. 1687-1692.
50. Mukherjee, S. Anti-bacterial activity of *Achatina* CRP and its mechanism of action / S. Mukherjee, S. Barman, N. C. Mandal, S. Bhattacharya // *Indian J Exp Biol.* – 2014. – Vol. 52, № 7. – P. 692-704.
51. Nelson, A. R. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications / A. R. Nelson, B. Fingleton, M.L. Rothenberg, L. M. Martisian // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 1135-1149.
52. Nguyen, A. D. Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism / A. D. Nguyen, H. Herzog, A. Sainsbury // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* – 2011. – Vol. 18. – P.56-60.
53. Nguyen, L. T. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action / L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel // *Trends in Biotechnology.* – 2011.– Vol. 29, № 9. – P. 464-472.
54. Nica, D. V. Bioaccumulative and conchological assessment of heavy metal transfer in a soil-plant-snail food chain / D. V. Nica, M. Bura, I. Gergen, M. Harmanescu, D. M. Bordean // *Chem Cent J.* – 2012. Vol. 6. – P 55.
55. Nowakowska, A. Defence against oxidative stress in two species of land snails (*Helix pomatia* and *Helix aspersa*) subjected to estivation / A. Nowakowska, M. Caputa, J. Rogalska // *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* – 2011. – Vol. 315, № 10. – P. 593-601.
56. Nusgens, B. V. Hyaluronie acid and extracellular matix: a primitive molecule? / B. V. Nusgens // *Ann. Dermatol.* – 2010. – Vol. 137. – P. 53-58.
57. O'Driscoll, N. H. Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application / N. H. O'Driscoll, O.

- Labovitiadi, T. P. T. Cushnie, K. H. Matthews, D. K. Mercer, A. J. Lamb // Current Microbiology. – 2013. – Vol. 66, № 3 – P. 271-278.
58. Palacios, O. Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins / O. Palacios, A. Pagani, S. Pérez-Rafael, M. Egg, M. Höckner, A. Brandstätter, M. Capdevila, S. Atrian, R. Dallinger // BMC Biology. – 2011. – Vol.9, №4. – P. 218-242.
 59. Papagianni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications / M. Papagianni // Biotechnol Adv. – 2003. – Vol. 21, № 6. – P. 465-499.
 60. Pears, N. V. Basic Biogeography / N. V. Pears. – 1985.
 61. Peng, S. Effects of Neuropeptide Y on Stem Cells and Their Potential Applications in Disease Therapy/ S. Peng, Y. Zhou, Z. Song, S. Lin // Stem Cells Int, – 2017. – Vol. 2017. – P. 12.
 62. Quave, C. L. Dermatological remedies in the traditional pharmacopoeia of Vulture-Alto Brandano, inland southern Italy / C. L. Quave, A. Pieroni, B C. Bennett // Ethnobiol Ethnomed. – 2008. – Vol. 4. – P. 124.
 63. Rambaruth, N. D. The lectin *Helix pomatia* agglutinin recognizes O-GlcNAc containing glycoproteins in human breast cancer / N. D. Rambaruth, P. Greenwell, M.V. Dwek // Glycobiology. – 2012. – Vol. 22, № 6. – P. 839-848.
 64. Raynova, Y. Phenoloxidase activity of *Helix aspersa maxima* (garden snail, gastropod) hemocyanin / Y. Raynova, L. Doumanova, K.N. Idakieva // Protein J. – 2013. – Vol. 32, № 8. – P. 609-618.
 65. Reddy, K. V. Antimicrobial peptides: premises and promises / K. V. Reddy, R. D. Yedery, C. Aranha // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 536-547.
 66. Runham, N. W. Terrestrial slugs / N.W. Runham, P.J. Hunter. – London: Hutchinson Univ. – 1970. – P. 184.

67. Ryu, H. Incorporation of heavy metals bioavailability into risk characterization / H. Ryu, J.S. Chung, T. Nam, H. S. Moon, K. Nam // *Clean.* – 2010. – Vol. 38. – P. 812-815.
68. Sanchez, J. F Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold / J. F. Sanchez, J. Lescar, V. Chazalet, A. Audfray, J. Gagnon, R. Alvarez, C. Breton, A. Imberty, E. P. Mitchell // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol.281, № 29. – P. 20171-10180.
69. Sitaram, N. Host-defense antimicrobial peptides: importance of structure for activity / N. Sitaram , R. Nagaraj // *Curr Pharm Des.* – 2002. – Vol. 8, № 9. – P. 727-742.
70. Smith, A. M. Robust cross-links in molluscan adhesive gels: testing for contributions from hydrophobic and electrostatic interactions / A. M. Smith, T. M. Robison, M. D. Salt, K. S. Hamilton, B. E. Silvia, R. Blasiak // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* – 2009. – P. 152.
71. Stepan, H O-Glycosylation of snails / H. Stepan, M. Pabst, F. Altmann, H. Geyer, R. Geyer, E. Staudacher // *Glycoconj J.* – 2012. – Vol. 29, № 4. – P.189-198.
72. Storey, K. B. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls / K. B. Storey, J. M. Storey // *Biol Rev Camb Philos Soc.* – 2004. – Vol. 79, № 1. – P. 207-233.
73. Sultana, A. A dipeptide YY derived from royall jelly proteins inhibits renin activity / A. Sultana, A. H. M. Nurun Nabi, H. Maruyama S, Mishima F // *Suzuki International journal of molecular medicine.* – 2008. – Vol. 21. – P. 677-681.
74. Teng, Y. Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanases, AfEG22, from the giant snail, Achatina fulica frussas / Y. Teng, Q. Yin, Ming ding., F. Zhao // *Acta Biochim Biophys Sin (Shandhai).* – 2010. – Vol. 42, № 10. – P. 729-734.
75. Titiek, B. Biochemical characterization of an antibacterial glycoprotein from Achatina fulica ferussac Snail Mucus local isolate and their implication on

- bacterial dental infection / B. Titiek, B. Edy, W. Suwarno. Indonesian J // Biotechnology. – 2007. – Vol. 12. – P. 943-951.
76. Venugopal, R. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future / R. Venugopal, C. Jyh-Yih // Peptides. – 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 415-420.
77. Vona-Davis, L. C. NPY family of hormones: clinical relevance and potential use in gastrointestinal disease / L. C. Vona-Davis, D. W. McFadden // Curr. Top. Med. Chem. – 2007. – Vol. 7. – P.1710-1720.
78. Werneke, S. W. The role of metals in molluscan adhesive gels / S. W. Werneke, C. Swann, L. A. Farquharson, K. S. Hamilton, A. M. Smith // Exp Biol. – 2007. – Vol. 210, № 12. – P.238-243.
79. Yanagawa, H. DNase A, a poly(dA) and poly(dT)-specific deoxyribonuclease from *Achatina fulica*. Purification and characterization / H. Yanagawa, Y. Ogawa, A. Miyakawa, F. Egami // J Biochem. – 1981. – Vol. 90, № 5. – P. 1463-1478.
80. Yeaman, M.R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / M. R. Yeaman, N. Y. Yount // Pharmacological reviews. – 2003. – V. 55, № 1. – P. 27-55.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

Направление подготовки

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Биохимия и
молекулярная биология»

Утверждаю

Зав. кафедрой

Карп Г. А. Карпова

«25» сентября 2017 г.

Задание

По ВКР студента Малащенко Татьяны Андреевны

Тема работы: «Сравнительная характеристика белкового и пептидного состава
печени наземных моллюсков»

Утверждена приказом по Университету от «29» декабря 2017 г. № 1381,

Срок сдачи студентом законченной работы «17» мая 2018 г.

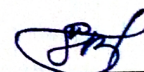
КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	Сентябрь 2017	Выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	Сентябрь-декабрь 2017	Выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	Сентябрь-декабрь 2017	Выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР (метод определения концентрации пептидов, метод гель-фильтрации)	Сентябрь-декабрь 2017	Выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	Январь 2018	Выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	Январь-февраль 2018	Выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	Январь 2018	Выполнено
8.	Разработать методику получения раствора белка и пептидов из ткани печени моллюска	Январь-февраль 2018	Выполнено
9.	Проведение первого этапа разделения белков и пептидов по молекулярной массе в супернатанте печени моллюсков двух семейств методом гель-фильтрации	Февраль-май 2018	Выполнено
10.	Проведение второго этапа определения количественного содержания белков и пептидов в супернатанте печени моллюсков двух разных семейств методом Лоури	Февраль-май 2018	Выполнено
11.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	Апрель-май 2018	Выполнено
12.	Определить количественное содержание белков и пептидов в печени моллюсков, которые жили в разных условиях (дикие улитки, одомашненные улитки, употребление различного корма улитками, содержание улиток в голоде)	Апрель-май 2018	Выполнено
13.	Обработка и анализ полученных	Апрель-май	Выполнено

	результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	2018	
14.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	Апрель-май 2018	Выполнено
15.	Итоговое оформление ВКР	Май 2018	Выполнено
16.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	Май 2018	Выполнено

Дата выдачи задания «25» 09 2018 г

Руководитель Соловьев В.Б.
д.б.н., профессор кафедры «ОБиБ»



Задание принял к исполнению
Малашенко Т.А.

