

На правах рукописи

Макарова Яна Владиславовна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ КОМПОНЕНТОВ
ЗМЕИНЫХ ЯДОВ: АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КУЛЬТУРЫ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ
НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК РС12**

Специальность 03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2016

Работа выполнена в Отделе молекулярных основ нейросигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Уткин Юрий Николаевич

Официальные оппоненты:

Чеботарева Наталья Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория структурной биохимии белка, ведущий научный сотрудник.

Хомутов Алексей Радиевич, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук.

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Анализ биологической активности новых белков представляет собой достаточно сложную задачу вследствие широкого диапазона возможных эффектов. Весьма перспективным является использование для такого анализа культур клеток, поскольку в основных этапах клеточного цикла: пролиферации, дифференцировке, миграции и гибели (некроз или апоптоз) – участвует большое число различных регуляторных систем (ферменты, рецепторы, ионные каналы и т.п.).

Яды змей, проявляющие ярко выраженные биологические эффекты, являются сложными белковыми смесями. Для целого ряда компонентов змеиных ядов достаточно хорошо установлены мишени на органном или молекулярном уровнях, однако механизмы их действия на клеточном уровне далеки от понимания даже для таких хорошо исследованных белков, как альфа-нейротоксины или фосфолипазы А2. С другой стороны, развитие новых методов выделения и анализа позволяет обнаружить новые белки, присутствующие в ядах в крайне малых количествах. Анализ биологической активности таких белков также значительно упрощается при использовании клеточных культур.

Таким образом, для установления или подтверждения механизмов действия новых белков, выделяемых из ядов змей, актуальным является исследование их эффектов на клеточных линиях. Наиболее подходящими для этого являются трансформированные клеточные линии: они относительно легко пролиферируют, сохраняют способность к миграции и дифференцировке; вещества, для которых будет показано влияние на такой тип клеток, могут оказаться ценными инструментами для изучения поведения опухолей, а также в качестве основы для разработки новых диагностических и лекарственных средств.

Нейроэндокринная клеточная линия РС12 в данном случае как нельзя лучше подходит для нейробиологических исследований, в частности при исследовании процессов дифференцировки и гибели нейронов, а также при исследовании белков, связывающихся с различного рода нейрональными рецепторами, которыми богата мембрана клеток РС12. Подобно не нейрональным клеткам, они размножаются, но под действием фактора роста нервов (ФРН) они перестают делиться, образуют нейриты и становятся очень похожими на симпатические нейроны. Клетки приобретают электрическую возбудимость, отвечают на ацетилхолин и даже образуют функциональные холинергические синапсы.

Цели и задачи работы

Цель данной работы – анализ биологической активности белков змеиных ядов, относящихся к различным структурно-функциональным семействам, с использованием линии нейроэндокринных клеток РС12. Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику исследования влияния изучаемых веществ на культуру нейроэндокринных клеток опухоли мозгового слоя надпочечников (феохромцитомы) крысы РС12.
2. Провести скрининг белков из различных структурно-функциональных семейств, выделенных из змеиных ядов, для обнаружения возможной цитотоксической и антипролиферативной активности.
3. Исследовать цитотоксическое и антипролиферативное воздействие белков змеиных ядов на клетки.
4. Провести анализ полученных результатов и предположить возможный механизм действия исследуемых компонентов.

Научная новизна и практическая ценность работы

При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые обнаружена способность протеиназ этого типа откреплять клетки PC12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибируют клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.

Исследование трехпетельных токсинов показало, что альфа-нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки феохромоцитомы, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и альфа-кобратоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении никотиновых рецепторов и исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий. При изучении фосфолипаз A2 змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток PC12 феохромоцитомы крысы. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА2 инициируют рост нейритов. Один из них включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА2 с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА2 и, возможно, включает участие протеинкиназ. В практическом плане полученные для ФЛА2 данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, или для использования дифференцирующей способности ФЛА2 при лечении нейрональных повреждений или нейродегенеративных заболеваний.

Апробация работы

Результаты работы представлялись на следующих симпозиумах и конференциях: Международной конференции по физико-химической биологии, посвященной 70-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова (Москва, 2004), научной конференции «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005), конференции "Рецепция и клеточная сигнализация" (Пушино, 2005), VIII чтениях, посвященных памяти академика Ю.А.Овчинникова (Москва-Пушино, 2006), 15th World Congress on Animal, Plant and Microbial toxins (Glasgow, 2006), 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology (Leuven, 2008), 8th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins (Hanoi, 2008), XX зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва-Пушино, 2008), 16th World Congress of the International Society on Toxinology (Recife 2009). V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск 2011), 9th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins, (Vladivostok 2011).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в реферируемых журналах, 11 тезисов в материалах отечественных и зарубежных конференций, получен один патент Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и списка литературы, включающего 206 цитируемых работ. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 32 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белки выделяли из ядов с использованием нескольких видов жидкостной хроматографии. На первом этапе яды фракционировали методом гель-фильтрации. Затем полученные фракции разделяли с помощью ионообменной хроматографии. На последнем этапе очищенные соединения получали в результате обращено-фазовой ВЭЖХ.

Оценка цитотоксичности компонентов проводилась с помощью МТТ-теста на линии клеток РС12. Клеточная линия РС12 представляет собой нейроэндокринные клетки опухоли мозгового слоя надпочечников крысы и является удобной моделью для исследования механизмов нейрональной дифференцировки и действия нейротрофных факторов.

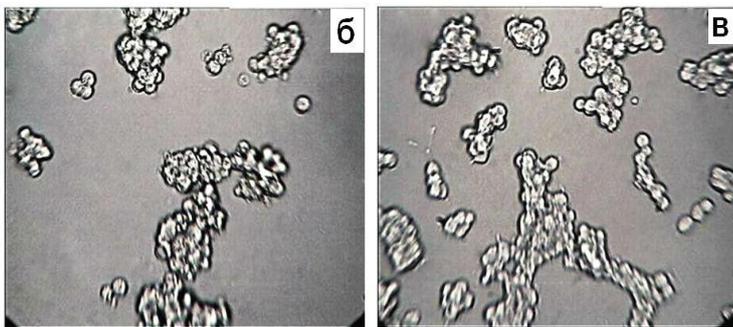
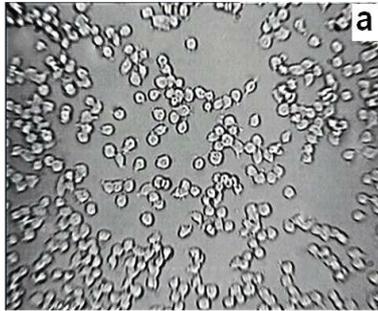
Клетки инкубировались в отсутствии (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. После 24-48ч культивирования клеток и исследуемых препаратов в питательной среде, содержащей фетальную бычью сыворотку при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в каждую лунку добавляется 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ). Через 2ч экспозиции при 37°C живые клетки восстанавливали желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Гранулы формазана растворяли в изопропанол, количество восстановленного продукта измеряли фотометрически при длине волны 540 нм. Выживаемость клеток в присутствии исследуемого препарата рассчитывали по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

При изучении цитотоксических и антипролиферативных свойств исследуемых веществ методом МТТ, учитывалось влияние этих веществ непосредственно на процесс дыхания. Превышение числа выживших клеток над контрольными в МТТ тесте связано с особенностями метода, который, измеряя суммарную активность дыхательных ферментов митохондрий, оценивает интенсивность метаболизма клеток, которая может усиливаться под действием исследуемых белков. Поэтому цитотоксичность была дополнительно исследована на автоматическом счётчике клеток Countess (Invitrogen). Прибор анализирует суспензии клеток, окрашенных раствором трипанового синего, который полностью прокрашивает только мёртвые клетки. Количество живых клеток нормировалось относительно количества в контрольных образцах (без добавок исследуемых компонентов), которое приравнивалось к 100%.

Нейритогенез оценивали с помощью микроскопии, фиксируя на фотоснимках морфологические изменения клеток и подсчитывая число клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона.

Оксиагин

Белок оксиагин был выделен из яда среднеазиатской кобры *Naja oxiana*. Анализ его аминокислотной последовательности показал, что оксиагин представляет собой металлопротеиназу репролизин, относится к Р-III классу МП и обладает металлопротеиназным, дезинтегрин-подобным и цистеин-богатым доменами.



Изучение влияния оксиагина на клетки PC12 показало, что при концентрации репролизина 10^{-5} - 10^{-6} М наблюдается кластеризация клеток (рис. 1). Можно предположить, что клетки открепляются от субстрата в результате либо металлопротеиназной, либо дезинтегриновой активности белка, либо в результате сочетания обеих.

Рисунок 1. Влияние оксиагина на адгезию PC12, а - контроль, б – оксиагин в концентрации 1мкМ и в – оксиагин в концентрации 10мкМ.

Как и следовало ожидать, потеря адгезивной способности клеток влечет за собой остановку пролиферации и приводит к гибели клеток, что и было обнаружено в тесте на цитотоксичность (рис. 2). Как известно, межклеточные взаимодействия, а также интегрин-опосредованное взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом несут огромную информацию для контроля морфогенеза, клеточных миграций, клеточной смерти, тканевой

репарации и индуцируют множество различных внутриклеточных ответов.

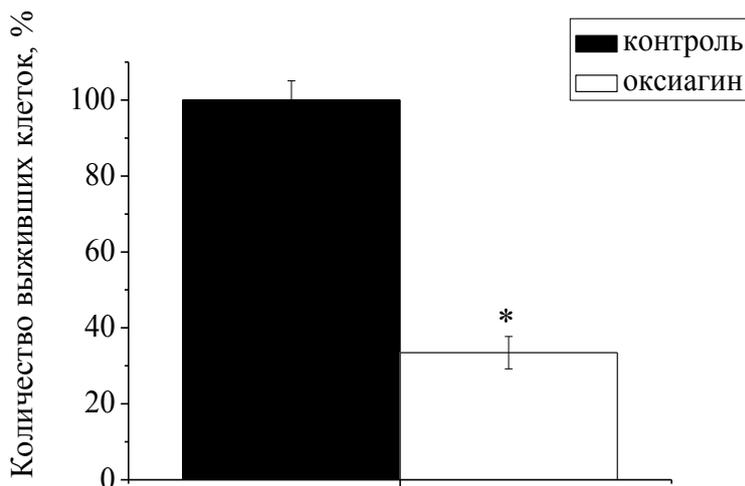


Рисунок 2. Определение цитотоксичности оксиагина (1мкМ) на автоматическом счетчике клеток (окрашивание трипановым синим), инкубация 96ч.

Металлопротеиназы расщепляют компоненты внеклеточного матрикса и гидролизуют различные факторы коагуляции в крови, срезают интегринные рецепторы клеток и/или конкурентно блокируют их, тем самым открепляя клетку от матрикса. В норме открепившаяся клетка, потеряв субстрат, гибнет в результате апоптоза, что показано для многих субстрат-зависимых клеток.

Трехпетельные токсины

При исследовании минорных компонентов яда кобры *Naja kaouthia* были обнаружены необычные белки, представляющие собой ковалентно-связанные димеры трехпетельных токсинов. Так, был выделен гомодимер α -кобратоксина - α СТ- α СТ с молекулярной массой 15,640 кДа и гетеродимеры: α -кобратоксина с цитотоксинами I - α СТ-СХ1 (14,515 кДа), II - α СТ-СХ2 (14,556 кДа) и III - α СТ-СХ3 (14,528 кДа). Методами электрофизиологии и радиолигандного анализа была установлена способность димеров связываться с нейрональными никотиновым ацетилхолиновыми рецепторами (НАХР) $\alpha 7$ и $\alpha 3\beta 2$ подтипов. Выяснилось, что гетеродимер α СТ-СХ3 не только активней гомодимера при связывании с $\alpha 7$ НАХР, но и существенно превосходит его при ингибировании $\alpha 3\beta 2$ НАХР (данные не приведены). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что димеризация необходима для активности трехпетельных токсинов против гетеромерных нейрональных НАХР.

Цитотоксичность

На клетках РС12 была исследована цитотоксичность представителей трех различных групп трехпетельных токсинов.

α -Кобратоксин из группы α -нейротоксинов длинного типа не проявил цитотоксического эффекта на клетках в концентрации до 100 мкМ. Нейротоксин II *Naja oxiana* из группы α -нейротоксинов короткого типа, и слабый токсин из группы нестандартных токсинов - WTX *Naja kaouthia* - не проявили цитотоксического эффекта на клетках в концентрации до 10 мкМ, а OWT из *Naja oxiana* в концентрации до 100 мкМ.

Исследование воздействия цитотоксинов на клетки РС12 показало, что они обладают разной степенью цитолитической активности. Были протестированы цитотоксины из разных ядов: цитотоксин II (СХ2) из яда *Naja oxiana*, цитотоксин III (СХ3) и цитотоксин V (СХ5) из яда *Naja kaouthia*. СХ2 и СХ3 начинали проявлять цитотоксический эффект при концентрациях больше 0,1 мкМ, а СХ5 больше 1 мкМ.

Таким образом, исследование мономерных трехпетельных токсинов показало, что альфа-нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки РС12, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность.

Исследование влияния гомодимера α СТ- α СТ на клетки РС12 показало, что подобно мономерному α СТ он не токсичен для клеток. При оценке цитотоксичности гетеродимеров, α -СТ-СХ2 и α -СТ-СХ3 положительным контролем служили цитотоксины II (СХ2) из *Naja oxiana* и III (СХ3) из *Naja kaouthia*. С этой целью клетки инкубировали с различными концентрациями белков в течение 48ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ и на автоматическом счётчике клеток Countess методом окрашивания трипановым синим. Обнаружено, что оба гетеродимера не вызывали изменений в РС12 в концентрации до 10 мкМ (рис. 3). Таким образом, исследуемые гетеродимеры сохранили способность связываться с НАХР мышечного и $\alpha 7$ подтипа, но потеряли цитотоксическую активность. Подобную потерю цитотоксичности наблюдали при исследовании еще одного минорного компонента яда кобры – гликозилированного цитотоксина. Одним из объяснений подобной модификации, уменьшающей цитотоксичность, может быть то, что таким способом клетки, экспрессирующие токсин, защищают себя от их токсического действия.

Ранее было установлено, что взаимодействие некоторых цитотоксинов с отрицательно заряженными липидами (такими как фосфатидилсерин или фосфатидилглицерин) приводит к их нековалентной димеризации – важному промежуточному этапу на пути к олигомеризации цитотоксинов. Было выдвинуто предположение, что олигомеризация цитотоксина способствует формированию пор и/или прямому литическому воздействию на мембрану.

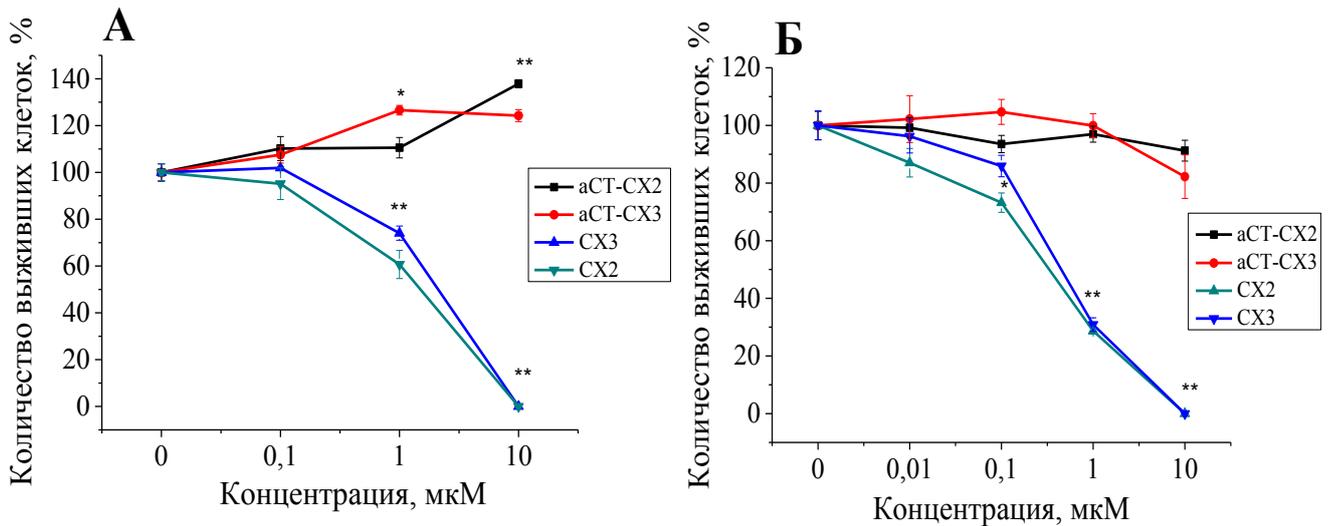


Рисунок 3. Сравнительный анализ цитотоксичности димеров (α -СТ-CX2 и α -СТ-CX3) и цитотоксинов (CX2 и CX3) методом МТТ (А) и с использованием автоматического счетчика клеток (Б, окрашивание трипановым синим). Клетки инкубировали с различными концентрациями токсинов в течение 48ч, * $p < 0,01$ по сравнению с контролем

В нашем случае, очевидно, что димеризация токсинов приводит к потере цитотоксичности. Возможно, α -СТ в гетеродимере препятствует формированию мембрано-активного цитотоксинового комплекса или закрывает цитотоксину участок, важный для его взаимодействия с мембраной. Потеря цитотоксичности - прекрасный пример изменения биологической активности белка, когда исчезновение одного типа активности (цитотоксичности) компенсируется новым (взаимодействие с $\alpha 3\beta 2$ nAHP).

Фосфолипазы А2

При скрининге биологической активности компонентов змеиных ядов особое внимание было уделено фосфолипазам А2 (ФЛА2). Для проведения исследований на клетках РС12 из ядов разных видов змей было выделено семь структурно и функционально различных фосфолипаз: ФГД-1, ФГД-2, СМ2, Ti-Nh, Vur-PL2A, Vur-PL2B и битанарин.

ФОСФОЛИПАЗЫ ФГД1, ФГД2 и СМ2

Структура и каталитические свойства

Ранее было установлено, что яд гадюки *V. nikolskii* содержит две различные гетеродимерные фосфолипазы (ФГД-1 и ФГД-2), состоящие из ферментативно активной и неактивной субъединиц. Обращенно-фазовая ВЭЖХ каждой фосфолипазы приводила к получению очищенных субъединиц, лишь одна из которых обладала фосфолипазной активностью. Ферментативно активные субъединицы, полученные из ФГД-1 и ФГД-2, будут далее обозначаться как ФГД-1Ф и ФГД-2Ф, а неактивные субъединицы как ФГД-1И и ФГД-2И, соответственно.

Фосфолипазная активность изолированных субъединиц ФГД-1Ф (1,25 ммоль/мин на мкмоль белка) и ФГД-2Ф (0,81 ммоль/мин на мкмоль белка), определенная с использованием флуоресцентного субстрата, превышала таковую исходных гетеродимерных ферментов ФГД-1 (0,56 ммоль/мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль/мин на мкмоль белка)

соответственно. У субъединиц ФГД-1И и ФГД-2И фосфолипазная активность не обнаружена.

По своему хроматографическому поведению и аминокислотным последовательностям выделенные белки *V. nikolskii* очень похожи на нейротоксические гетеродимерные ФЛА2 випоксин (viroxin) из яда гадюки *V. ammodytes* и васпин (vaspin) из яда *V. aspis*. Очень близки по свойствам и структуре к этим ферментам также кротоксин (crotoxin) из яда гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus* и нейротоксическая ФЛА2 из яда тайваньской гадюки *V. russelli formosensis*. Все эти белки относятся к группе ПА суперсемейства ФЛА2.

Используемая в данной работе ФЛА2 из яда кобры *N. kaouthia* по молекулярной массе и N-концевой аминокислотной последовательности соответствует кислой ФЛА2 CM2, выделенной ранее из того же яда. Этот фермент относится к группе IA.

Цитотоксичность

Одним из основных биологических свойств ФЛА2 ядов змей является способность вызывать гибель клеток. В наибольшей степени цитотоксичность проявляется при воздействии так называемых миотоксических ферментов на клетки скелетных мышц, токсичность ФЛА2 по отношению к клеткам других типов, как правило, ниже. При изучении влияния гетеродимерных ФЛА2 *V. nikolskii* на жизнеспособность клеток РС12 было установлено, что, как и следовало ожидать, число выживших клеток уменьшалось по мере роста концентрации ФГД-1 и ФГД-2 в среде (рис. 4), при этом большей цитотоксичностью обладала фосфолипаза ФГД-2. Цитотоксичность гетеродимерных фосфолипаз гадюки *V. nikolskii* оказалась выше чем токсичность ФЛА2 кобры *N. kaouthia* (для всех исследованных концентраций различия также значимы с $p < 0,01$) (рис. 4).

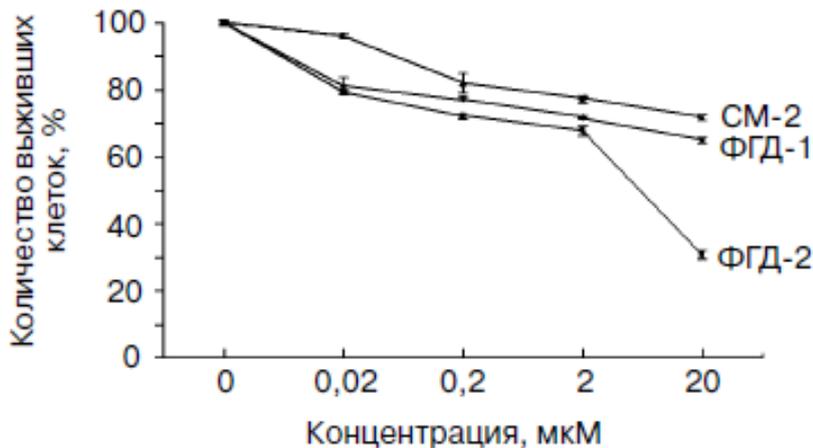


Рисунок 4. Зависимость количества выживших клеток РС12 от концентрации ФЛА2 змеиных ядов. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 24ч. и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ.

Исследование индивидуальных компонентов, формирующих гетеродимерные ФЛА2 *V. nikolskii*, показало, что белки ФГД-1И и ФГД-2И не обладали цитотоксичностью. Ферментативно активные субъединицы ФГД-1Ф и ФГД-2Ф (рис. 5), обладающие большей ферментативной активностью (1,25 и 0,81 ммоль/мин на мкмоль белка соответственно), проявляли более высокую цитотоксичность по сравнению с исходными белками ФГД-1 (ферментативная активность - 0,56 ммоль/мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль/мин на мкмоль белка) соответственно.

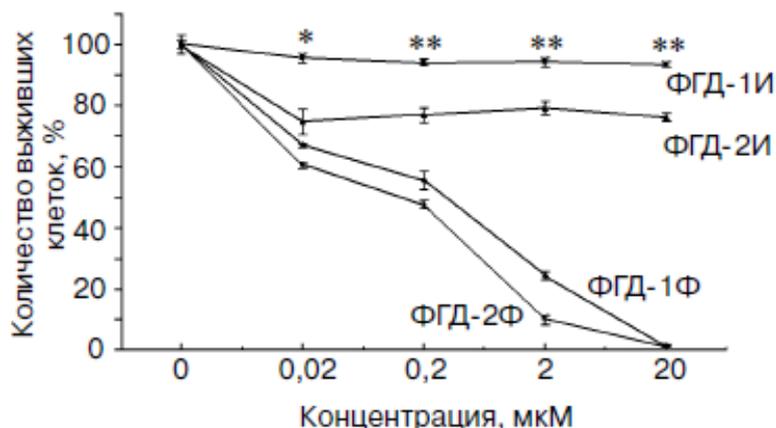


Рисунок 5. Зависимость количества выживших клеток РС12 от концентрации изолированных субъединиц ФЛА2 *V. nikolskii*. Клетки инкубировали с различными концентрациями субъединиц в течение 24ч. и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ ($p < 0,01$, $*p < 0,06$ и $**p < 0,02$ по сравнению с контролем).

Совместная предварительная инкубация белков ФГД-1И и ФГД-2И с белками ФГД-1Ф и ФГД-2Ф, соответственно, значительно снижала токсичный эффект последних. При этом согласно данным ионообменной хроматографии в результате взаимодействия индивидуальных субъединиц происходит реконструкция гетеродимерных фосфолипаз ФГД-1 и ФГД-2, которые обладают меньшей цитотоксичностью по сравнению с ферментативно активными субъединицами (ФГД-1Ф и ФГД-2Ф соответственно).

Полученные нами данные о наличии цитотоксичности лишь у ферментативно активных белков находятся в согласии с данными других авторов, полученными для фосфолипаз из иных источников. Так, цитотоксичный эффект кротоксина проявлялся только при диссоциации гетеродимера с образованием ферментативно активной субъединицы В. Таким образом, цитотоксический эффект ФЛА2 для клеток РС12 обусловлен, по-видимому, ферментативной активностью фосфолипаз и вызван нарушением целостности мембраны клетки.

Нейритогенез

Секреторные белки из грибов и бактерий, обладающие фосфолипазной активностью, а также ФЛА2 пчелиного яда (группа III) и мозга эмбрионов мышей (группы V и X), относящиеся к разным группам секретируемых фосфолипаз, индуцируют в разной степени рост нейритов у клеток линии РС12. При этом максимальный эффект после инкубации клеток с ФЛА2 в течение 48ч. наблюдался при концентрации 10 нМ для фермента пчелиного яда, 0,1 мкМ – для грибкового фермента р15 и 1 мкМ – для фермента Scp15 из *Streptomyces coelicolor*. Важно заметить, что все эти белки по четвертичной структуре относятся к мономерным ФЛА2. Проведенные нами исследования показали, что гетеродимерные ФЛА2 яда гадюки в диапазоне концентраций от 0,2 до 20 мкМ также вызывают рост нейритов у клеток РС12 (рис. 6). Уменьшение количества клеток с нейритами при концентрации ФГД-1 более 0,2 мкМ (рис. 7) можно объяснить меньшей устойчивостью дифференцированных клеток к цитотоксическому действию этого фермента. Аналогичная проходящая через максимум концентрационная зависимость нейритогенеза наблюдалась для ФЛА2 пчелиного яда. Для ФГД-2 подобного эффекта обнаружено не было. Индукция роста нейритов ФЛА2 яда кобры воспроизводимо наблюдалась лишь при концентрации более 2 мкМ (рис. 7). Рост нейритов обнаружен как при инкубации клеток с нативными гетеродимерными белками ФГД-1 и ФГД-2, так и после их реконструкции в результате совместной инкубации изолированных субъединиц (данные не представлены).

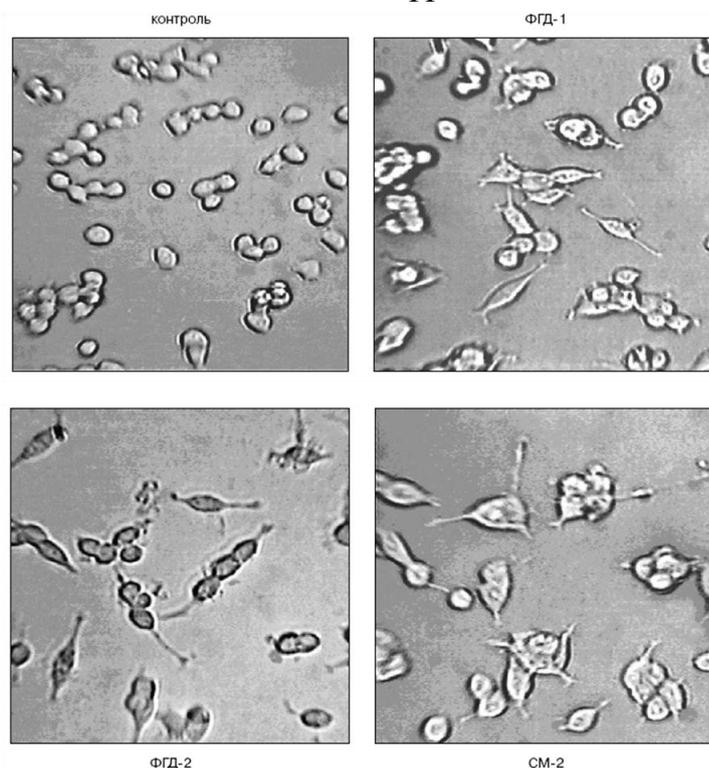


Рисунок 6. Рост нейритов в культуре клеток PC12 после инкубации с ФЛА2 из ядов змей в течение 24ч. Концентрация ФЛА2: ФГД--1 и СМ-2 – 20 мкМ, ФГД--2 – 2 мкМ.

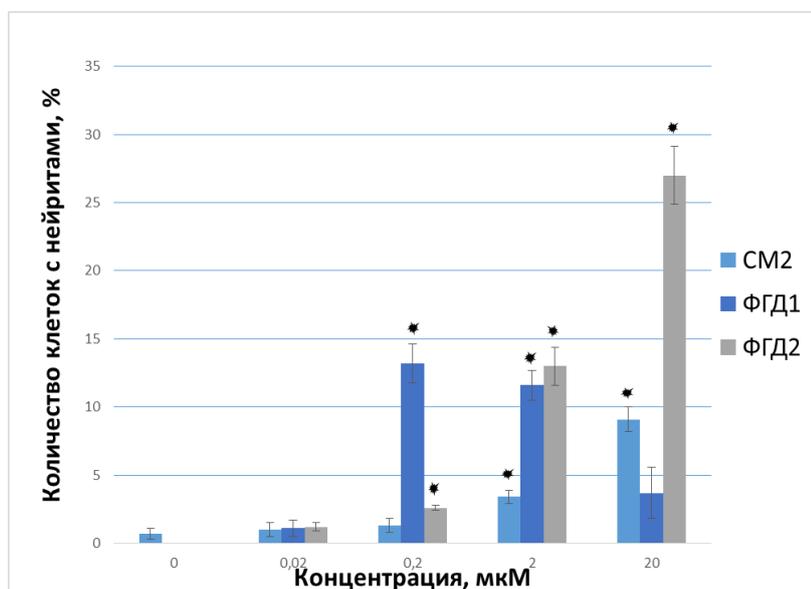


Рисунок 7. Зависимость нейритогенной активности ФЛА2 от концентрации. Клетки инкубировали с белками в течение 24ч. и затем подсчитывали клетки с нейритами * $p < 0,01$ по сравнению с контролем. Различия между ФГД-1 и ФГД-2, ФГД-1 и СМ-2, ФГД-2 и СМ-2 при концентрации 20 мкМ статистически значимы ($p < 0,05$).

*Возможный механизм нейритогенеза, индуцированного ФЛА2 *V. nikolskii**

Что касается возможного механизма этого эффекта, то имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что способность ФЛА2 вызывать рост нейритов коррелирует с энзиматической активностью белка. Этот вывод хорошо согласуется с нашими данными об индукции роста нейритов ферментативно активными белками. Обнаружить нейритогенную активность у изолированных субъединиц ФЛА2 гадюки *V. nikolskii* не удалось, поскольку энзиматически активные субъединицы обладают сильной цитотоксичностью, а другие субъединицы не активны вовсе.

Было установлено, что рост нейритов РС12 индуцируется лизофосфатидилхолином, образующимся при деградации фосфолипидов мембраны клетки под действием ФЛА2, а различная способность ФЛА2 разных типов стимулировать рост нейритов находится в прямой зависимости от их способности высвобождать лизофосфатидилхолин из клеточной мембраны. Возможно, способность ФЛА2 из ядов змей индуцировать рост нейритов при более высоких концентрациях по сравнению с ферментами других групп объясняется меньшей ферментативной активностью змеиных белков по отношению к фосфолипидам клеточной мембраны РС12. Однако, в работах других авторов отсутствуют данные о специфической (удельной) активности ФЛА2, индуцирующих рост нейритов. Поскольку измеренная удельная активность фермента сильно зависит как от природы субстрата, так и от используемого метода, сравнивать эти величины следует с большой осторожностью.

Тем не менее, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что ФЛА2 пчелиного яда при гидролизе флуоресцентных аналогов фосфатидилхолина превосходит по активности кротоксин на 2–3 порядка. Как уже отмечалось выше, исследованные нами ФГД-1 и ФГД-2 структурно весьма схожи с кротоксином, а определенная нами с использованием флуоресцентного аналога фосфатидилхолина фосфолипазная активность ФГД-1 (0,56 ммоль/мин на мкмоль белка) и ФГД-2 (0,31 ммоль/мин на мкмоль белка) очень близка к активности кротоксина (0,69 ммоль/мин на мкмоль белка), определенной с использованием того же метода и субстрата.

На основании этих данных можно предположить, что активность ФГД-1 и ФГД-2 при гидролизе фосфатидилхолина клеточной мембраны РС12 также будет меньше активности ФЛА2 пчелиного яда на несколько порядков. Это предположение хорошо согласуется с обнаруженной нами способностью ФГД-1 и ФГД-2 вызывать рост нейритов при более высоких концентрациях, чем это было показано для ФЛА2 пчелиного яда. Для того чтобы установить, действительно ли в случае ФГД-1 и ФГД-2 гидролиз фосфатидилхолина происходит при тех концентрациях фермента, которые индуцируют рост нейритов, мы анализировали фосфолипиды клеток РС12 методом MALDI-масс-спектрометрии.

На рис. 8 представлены данные, полученные без воздействия ФГД-1 на клетки (а), а также после инкубации клеток с ферментом в концентрации 0,02 мкМ (б) и 0,2 мкМ (в). Следует отметить, что при 0,02 мкМ нейриты практически отсутствуют, а при 0,2 мкМ доля дифференцированных клеток составляет около 13% (рис. 7). Как видно из рисунка 8, при увеличении концентрации ФГД-1 происходит уменьшение интенсивности сигналов с отношениями массы к заряду молекул в диапазоне от 720 до 830, соответствующих различным подклассам фосфатидилхолина, и возрастание интенсивности сигналов с отношениями массы к заряду молекул в диапазоне от 480 до 550, соответствующих различным подклассам лизофосфатидилхолина. Сильнее всего возрастает интенсивность сигналов, соответствующих подклассам С16 : 0 (m/z 496) и С18 : 0 (m/z 524), которые, как было показано другими исследователями, могут индуцировать рост нейритов. Аналогичная картина наблюдается в случае ФГД-2 (данные не приведены).

Описанный механизм нейритогенеза отличается от уже известного действия фактора роста нервов, стимулирующего рост нейритов посредством взаимодействия со специфическими рецепторами нервных клеток. Более того, ФЛА2 способна усиливать действие фактора роста нервов и, вероятно, может принимать участие в процессе дифференцировки клеток РС12. Таким образом, ФЛА2 ядов змей способны индуцировать рост нейритов клеток РС12, подобно упоминавшимся выше другим секретиремым фосфолипазам. Этот эффект впервые обнаружен нами у ФЛА2 групп I и II, в том числе и у гетеродимерных фосфолипаз А2

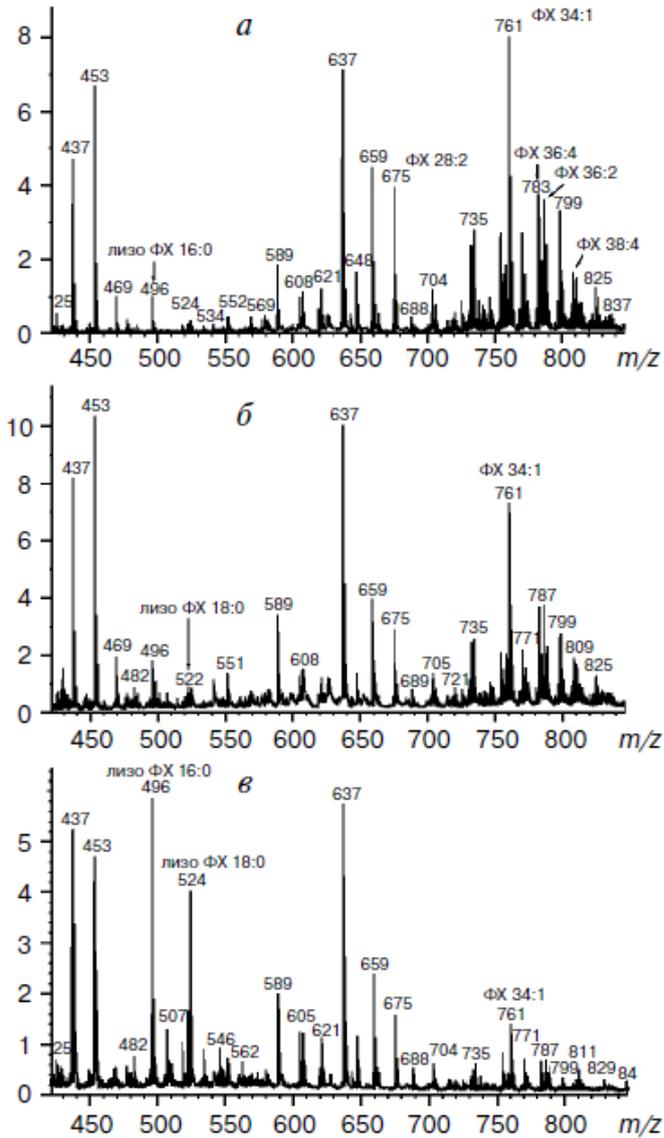


Рисунок 8. Анализ фосфолипидов клеточной мембраны PC12 методом MALDI масс-спектрометрии. *а* – Контроль без обработки клеток ФЛА2; *б* и *в* – после инкубации клеток с ФГД-1 в концентрации 0,02 и 0,2 мкМ соответственно. Указаны подклассы фосфатидилхолина (ФХ) и лизофосфатидилхолина (лизо ФХ). По оси ординат отложена интенсивность сигнала в относительных единицах, по оси абсцисс – отношение массы к заряду молекул (m/z)

ФОСФОЛИПАЗА Ti-Nh яда *Naja haje*

Из яда кобры *Naja haje* был выделен белок с молекулярной массой 14 340 Да, обладающий способностью ингибировать тромбин и названный Ti-Nh (**T**hrombin **i**nhibitor from **N**aja **h**aje). Этот белок состоит из одной полипептидной цепи с 14 цистеиновыми остатками, образующими 7 внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Структурная характеристика этого белка показала, что он относится к группе IV суперсемейства ФЛА2. Уникальность данной фосфолипазы состоит в том, что она единственная из фосфолипаз ядов змей семейства *Elapidae* способна подавлять фибринолитическую и амидолитическую активность тромбина, и соответственно тромбин-индуцируемую агрегацию тромбоцитов. Ti-Nh первый тромбиновый ингибитор, выделенный из ядов змей семейства *Elapidae*, и первая ФЛА2, ингибирующая тромбин. ФЛА2 Ti-Nh обладает низкой фосфолипазной активностью. Так скорость гидролиза флуоресцентного субстрата этой ФЛА2 примерно на 5 порядков ниже, чем у CM2 (табл. 1). Тромбин-ингибиторные свойства Ti-Nh не зависят от его ферментативной активности, и это согласуется с гипотезой Kini (Kini, 2003) о том, что ФЛА2 могут проявлять антикоагулянтный эффект посредством неферментативного белок-белкового взаимодействия.

Таблица 1. Ферментативная активность ФЛА2 змеиных ядов, субстрат - 1-пальмитоил-2-(10-пиренилдеcanoил)-sn-глицеро-3-фосфохолин

| ФЛА2 | Вид змеи | Активность (ммоль липидов/мин. на мкмоль белка) |
|------------------|------------------------------|---|
| Ti-Nh | <i>N. haje</i> | 0,000017 |
| CM2 | <i>N. kaouthia</i> | 2,22 |
| ФГД-1 | <i>Vipera nikolskii</i> | 0,56 |
| Кротоксин | <i>Crotalus durissus</i> | 0,096 |
| β- Бунгаротоксин | <i>Bungarus multicinctus</i> | 0,000087 |

По данным МТТ-теста, Ti-Nh в отличие от других ФЛА2 не проявила цитотоксичность по отношению к клеткам PC12 даже в высоких концентрациях (рис. 9). Более того, Ti-Nh стимулирует рост нейритов с активностью, сравнимой с ФЛА2 CM2 (рис. 10; рис. 11).

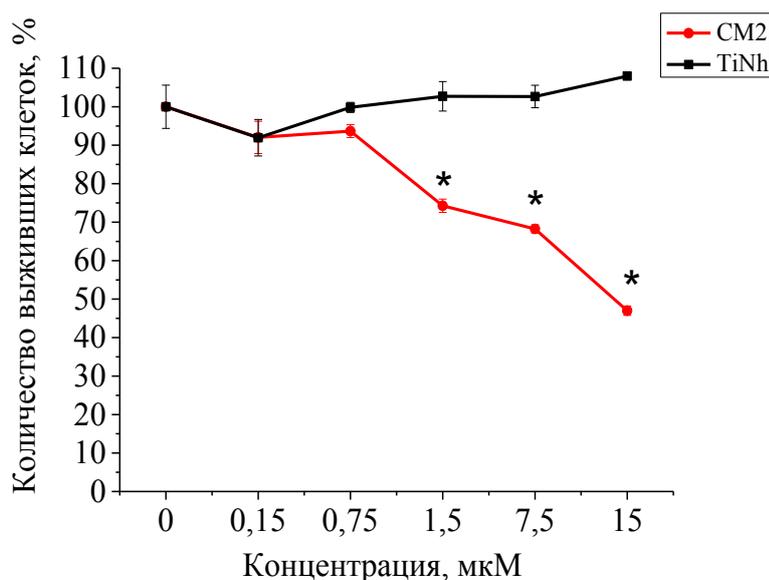


Рисунок 9. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации фосфолипаз Ti-Nh и CM2. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ, * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Результаты исследований Ti-Nh выявили ряд интересных особенностей - белок проявляет селективный тромбин-ингибирующий эффект в диапазоне 10 - 100 нМ, но не оказывает цитотоксического эффекта на клетках в концентрациях вплоть до 15 мкМ. Не обладая сильной ферментативной активностью, Ti-Nh индуцирует нейрональную дифференцировку PC12. Учитывая исследования, выявляющие связь ферментативной активности фосфолипаз с процессами дифференцировки, механизм нейритогенеза при низкой ферментативной активности фосфолипазы Ti-Nh остается не ясным. Можно лишь предположить, что существует альтернативный механизм дифференцировки, независимый от ферментативной активности.

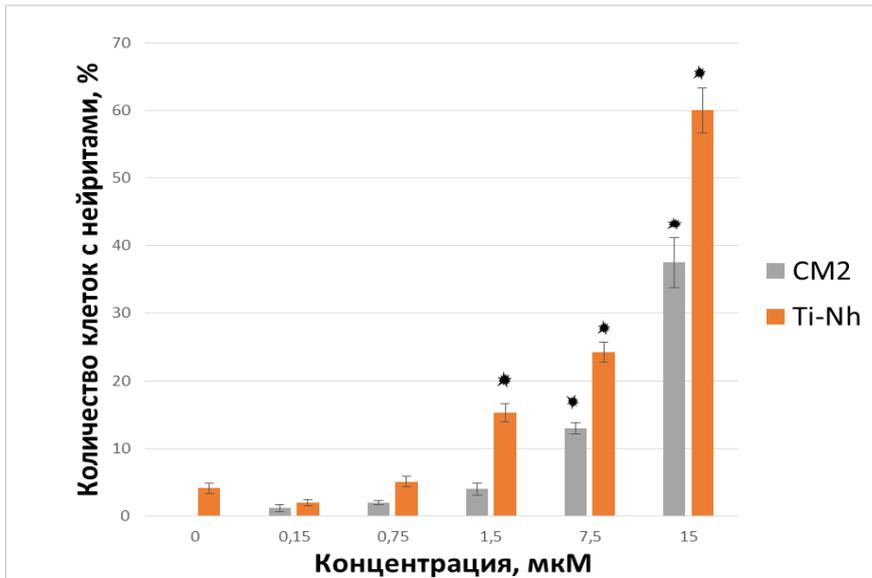


Рисунок 10. Влияние Ti-Nh и CM2 на рост нейритов у клеток PC12, 48ч.

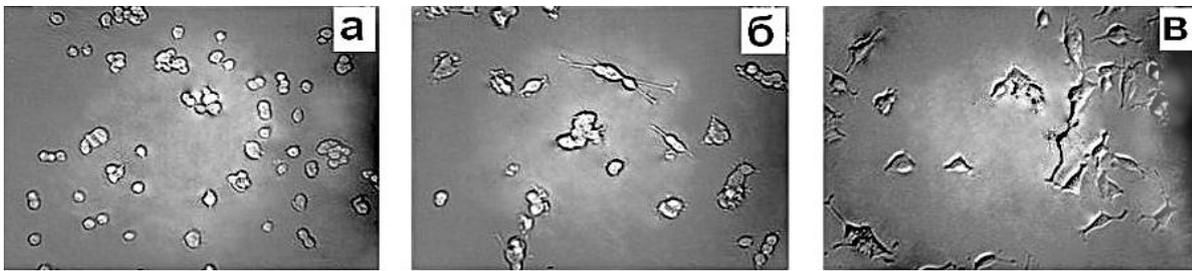


Рисунок 11. Нейритогенез PC12 под действием Ti-Nh. а – контроль, б - 15мкМ, в - 7,5 мкМ , 48 ч.

ФОСФОЛИПАЗЫ *Vur-PL2A* и *Vur-PL2B*

Из яда гадюки *Vipera ursinii renardi* были выделены две изоформы фосфолипазы Vur-PL2: Vur-PL2A и Vur-PL2B, не отличающиеся по аминокислотной последовательности. Они имеют молекулярную массу 13,5 кДа и относятся ко II группе фосфолипаз A2. По первичной структуре Vur-PL2 близка ФЛА2 аммодитину I из яда *V. ammodytes*. Vur-PL2B обладает сильным антикоагулянтным и антитромбоцитарным свойством, но проявляет слабую цитотоксичность по отношению к PC12 (рис. 12).

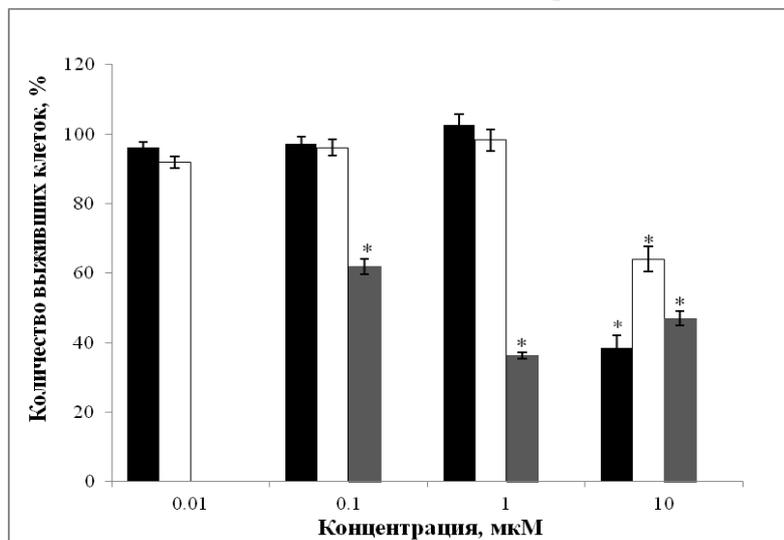


Рисунок 12. Зависимость количества выживших клеток PC12 от концентрации фосфолипаз: Vur-PL2A – черные столбцы, Vur-PL2B - белые столбцы и CM2 - серые столбцы. Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Это первый случай присутствия сильного антикоагулянтного аналога аммодитина I в яде гадюк. Способность Vur-PL2B индуцировать рост нейритов сравнима с таковой CM2 (рис. 13; рис. 14).

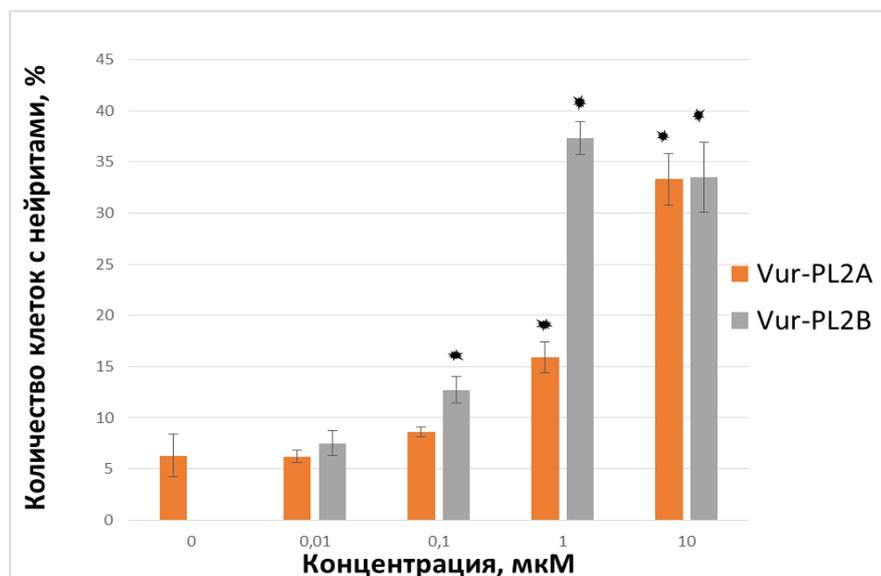


Рисунок 13. Влияние Vur-PL2A и Vur-PL2B на рост нейритов у клеток PC12, 48ч.

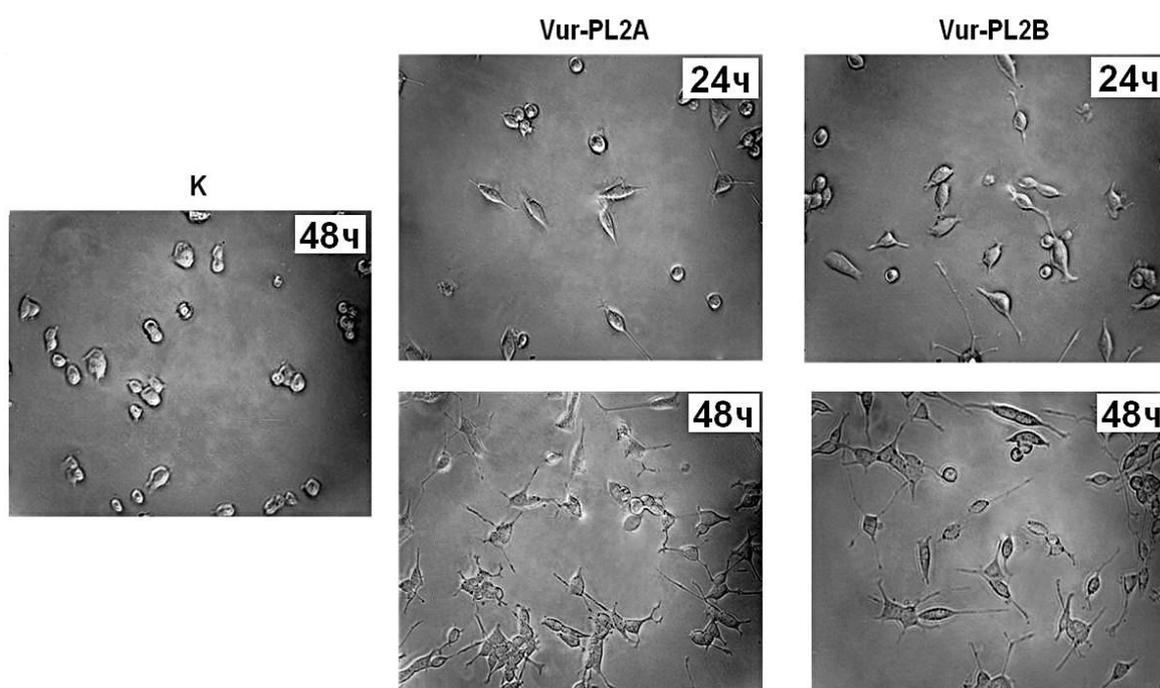


Рисунок 14. Нейритогенез PC12, под действием фосфолипаз Vur-PL2A и Vur-PL2B в концентрации 10мкМ. Инкубация 24 (верхний ряд) или 48 (нижний ряд) часов.

ФОСФОЛИПАЗА *Bitis arietans* (битанарин)

Из яда *Bitis arietans* был выделен уникальный белок – битанарин (***Bitis arietans*** ***nicotinic acetylcholine receptor inhibitor***) с молекулярной массой 27,4 кДа и 14 дисульфидными мостиками, обладающий фосфолипазной активностью и способностью блокировать нАХР. Наибольшее сходство по аминокислотной последовательности битанарин имеет с ФЛА2 из *Bothrops asper*, что делает его уникальной мономерной фосфолипазой, относящейся к группе ПА ФЛА2. Фосфолипазная активность битанарина (1,95 ммоль/мин на мкмоль белка) близка к активности фолсфолипазы кобры CM2 (2,22 ммоль/мин на мкмоль белка).

Исследование влияния битанарина на РС12 показало, что в отличие от фосфолипазы кобры битанарин не проявлял цитотоксичности до концентрации 10 мкМ (рис. 15).

Так же, как и остальные исследованные нами ФЛА2, битанарин стимулировал рост нейритов РС12, однако в отличие от всех других ферментов, его дифференцирующая активность была очень высока и проявлялась уже при низких концентрациях (рис.16, рис. 17). При увеличении времени инкубации с фосфолипазами, процесс дифференцировки

усиливался, происходило ветвление и увеличение длины нейритов (рис. 18).

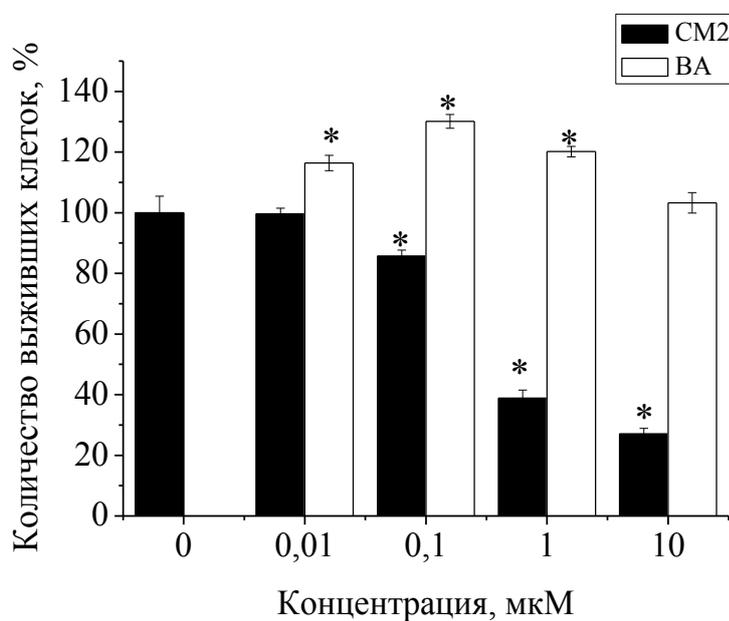


Рисунок 15. Зависимость количества выживших клеток РС12 от концентрации битанарина (белый) и SM2 (черный). Клетки инкубировали с различными концентрациями ФЛА2 в течение 48ч и затем определяли количество живых клеток окрашиванием с МТТ. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

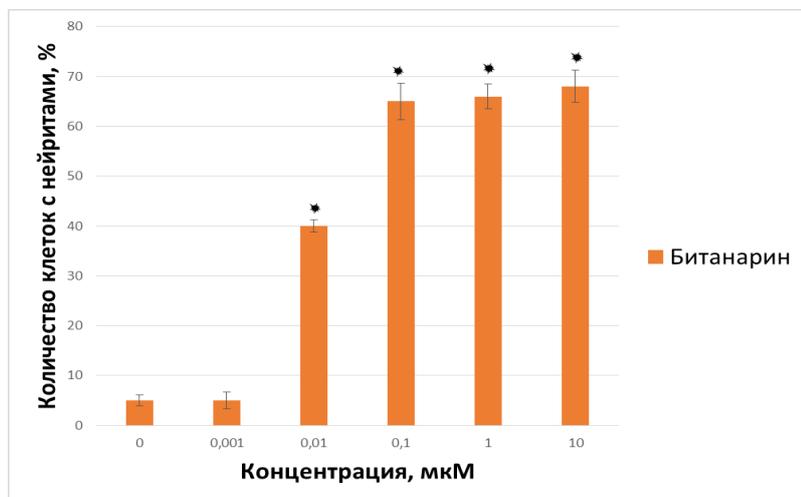


Рисунок 16. Влияние битанарина на рост нейритов у клеток РС12, 48ч.

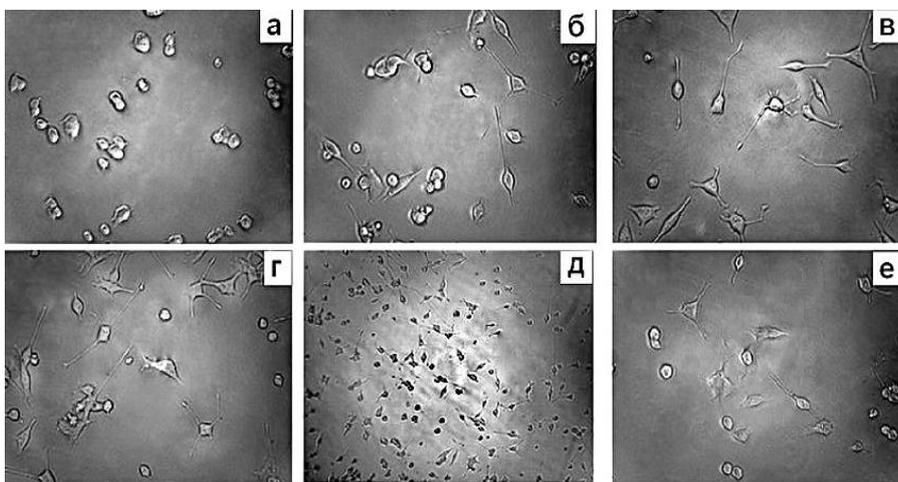


Рисунок 17. Нейритогенез РС12 под действием битанарина в концентрациях: а – 0 (контроль), б - 10мкМ, в - 1мкМ, г и д - 0,1мкМ, е- 0,01мкМ, 48ч.

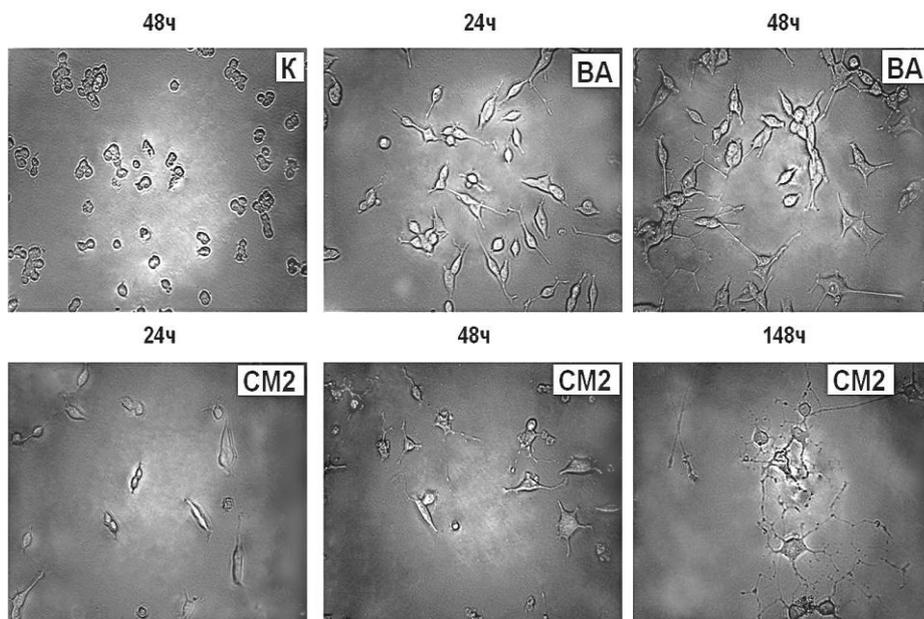


Рисунок 18. Дифференцировка PC12 при разных временах инкубации с ФЛА2 CM2 (нижний ряд) и битанарином (BA, верхний ряд). Концентрация - 10 мкМ.

Возможные механизмы нейритогенной активности фосфолипаз ядов змей

Сопоставляя представленные выше данные, суммированные в табл. 2, можно сделать вывод о неоднозначности влияния различных ФЛА2 на рост нейритов в клетках PC12 и предположить по крайней мере два механизма нейритогенного воздействия ФЛА2 на клетки:

1) Нейритогенез, зависящий от ферментативной активности ФЛА2.

Ранее уже отмечалось, что ФЛА2 пчелиного яда превосходит по ферментативной активности ФЛА2 кротоксин на 2–3 порядка. ФГД -1 и ФГД-2 имеют ферментативную активность близкую активности кротоксина. Если предположить каталитическую природу нейритогенеза, то активность ФГД-1 и ФГД-2 при гидролизе фосфатидилхолина клеточной мембраны PC12 также будет меньше активности ФЛА2 пчелиного яда на несколько порядков. Это предположение хорошо согласуется с обнаруженной нами способностью ФГД-1 и ФГД-2 вызывать рост нейритов при более высоких концентрациях, чем это было показано для ФЛА2 пчелиного яда. Метод MALDI-масс-спектрометрии так же выявил, что катализируемый ФГД-1 и ФГД-2 гидролиз фосфатидилхолина происходит при тех же концентрациях фермента, которые индуцируют рост нейритов (рис. 8) (при увеличении концентрации ФГД-1 происходит резкое уменьшение интенсивности сигналов с массами в диапазоне от 720 до 830 Да, соответствующих различным подклассам фосфатидилхолина, и параллельное возрастание интенсивности сигналов с массами в диапазоне от 480 до 550 Да, соответствующих различным подклассам лизофосфатидилхолина).

Для грибной, пчелиной и ряда других фосфолипаз ферментативная активность необходима для нейритогенеза, который в отличие от нейритогенеза, индуцированного фактором роста нервов, блокируется ингибиторами кальциевых каналов L-типа. Особенную роль в этом нейритогенезе играет лизофосфатидилхолин. Он вовлечен в такие клеточные ответы как активация фосфолипазы C, протеинкиназы C, повышение внутриклеточного Ca^{2+} и воздействие на митоген-активируемую протеинкиназу.

Также эффект лизофосфатидилхолина может быть опосредован через сопряженные с G-белком лизофосфатидилхолиновые рецепторы G2A и GPR4, которые индуцируют выброс Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ.

Таблица 2. Свойства ФЛА2 ядов змей.

| ФЛА2 | Группа | Мол. масса, кДа | Ферментативная активность, ммоль/мин на мкмоль белка | Цитотоксичность. Концентрация белка, при которой гибнет более половины клеток в течение 48 ч, мкМ | Нейритогенез. Максимальное количество клеток с нейритами, длина которых превышает длину тела нейрона, наблюдаемое в диапазоне концентраций 0,01-20 мкМ, инкубация 48 ч, % | Особые свойства |
|-----------|--------|-----------------|--|---|---|--|
| СМ2 | IA | 13,3 | 2,22 | >1 | 37,5 | |
| ФГД-1 | IIA | 27,5 | 0,56 | >10 | 25 | Гетеродимер, состоящий из ферментативно-активной и неактивной субъединиц |
| ФГД-2 | IIA | 27,5 | 0,31 | >1 | 41 | |
| Ti-Nh | IVB | 14,3 | 0,000017 | | 60 | Ингибитор тромбина |
| Vur-PLA | IIA | 13,5 | - | >5 | 33 | Антикоагулянтная, антитромбоцитарная активность |
| Vur-PLB | IIA | 13,5 | - | >10 | 37 | |
| Битанарин | IIA | 27 | 1,95 | | 68 | Блокирует нейрональные и мышечные nAHP |

Такой механизм действия через кальциевые каналы похож на САМ (cell adhesion molecules)-опосредованный нейритогенез, который в отличие от нейритогенеза, индуцированного ФРН, зависит от активности кальциевых каналов L и N типов, и сопровождается накоплением арахидоновой кислоты (АК). Также в отличие от нейритогенеза, индуцированного ФРН, действие этих ФЛА2 было нечувствительно к ингибитору тирозинкиназ К-252а.

2) Помимо нейритогенеза, обусловленного каталитической активностью ФЛА2, в литературе имеются данные о взаимодействии некоторых ФЛА2 с белковыми рецепторами. Разнообразие физиологических эффектов змеиных ФЛА2 связывают с существованием специфических высоко аффинных рецепторов для этих ферментов. Антитромбиновая активность Ti-Nh и взаимодействие битанарина с nAHR также указывают на способность этих ФЛА2 к белок-белковым взаимодействиям, а следовательно и на существование возможности лиганд-рецепторных взаимодействий. Ti-Nh имеет низкую фосфолипазную активность, но довольно хорошо дифференцирует клетки. Из всех исследованных нами фосфолипаз наибольший интерес представляет битанарин. Его ферментативная активность, близка по значению к таковой CM2, однако он обладает самой высокой нейритогенной активностью по сравнению со всеми остальными ФЛА2. Диапазон ее действия самый широкий из представленных здесь ФЛА2 (10^{-5} - 10^{-8} М). Кроме того, в испытанных концентрациях битанарин не обладал цитотоксичностью.

Проведенные нами исследования змеиных фосфолипаз вкупе с литературными данными указывают на существование различных механизмов (ферментативного и неферментативного, предположительно, рецепторного) нейритогенного воздействия, детали которых еще предстоит расшифровать.

Для подтверждения гипотезы о нейритогенном воздействии ФЛА2 посредством механизма с участием рецепторных белков мы использовали ингибитор рецепторных тирозинкиназ К-252а. Взаимодействуя с Trk А рецептором этот ингибитор блокирует нейритогенез, индуцированный фактором роста нервов. Помимо действия на тирозинкиназный рецептор, К-252а влияет также на протеинкиназу С и протеинкиназы, зависимые от циклических нуклеотидов. В экспериментах с использованием битанарина, К-252а в концентрации выше 100нМ блокировал нейритогенез, вызванный этим белком (рис. 19). В качестве контроля был использован ФРН яда кобры, эффект которого также подавлялся К-252а. На каком этапе К-252а выключает клеточную дифференцировку пока не ясно.

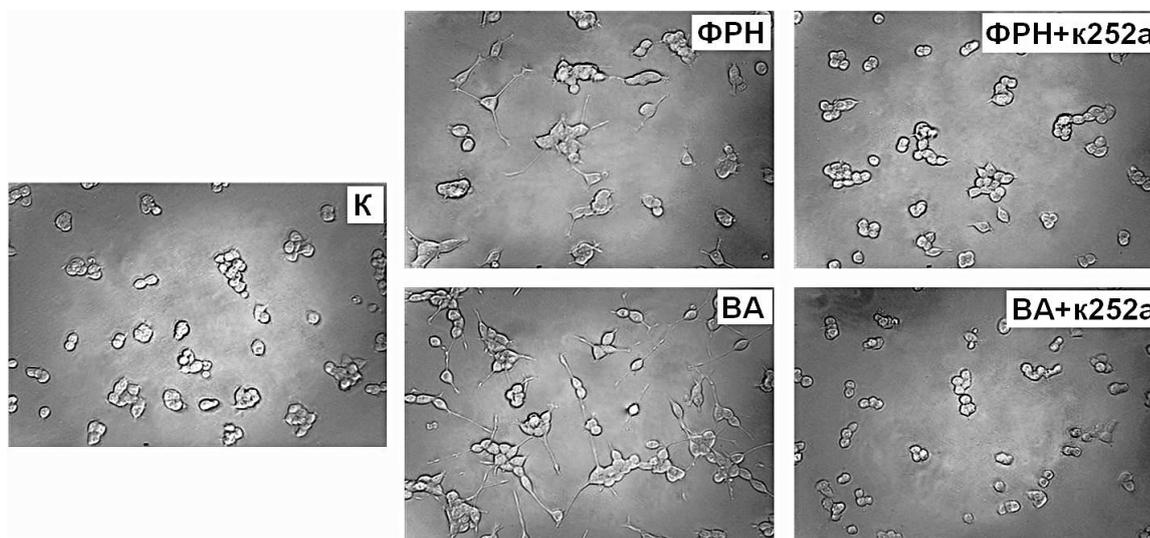


Рисунок 19. Влияние К-252а на дифференцировку РС12, индуцированную фактором роста нервов и битанарином.

Если проводить аналогию с нейритогенезом, индуцированным ФРН, то вполне вероятно, что блокировка происходит на уровне протеинкиназы С, которая принимает участие в передаче сигнала, запускаемого ФРН.

В результате выполненной работы нами исследовано действие белков из ядов змей на клеточную культуру РС12 феохромоцитомы крысы. Исследованные белки относятся к наиболее представленным в ядах змей семействам белков: фосфолипазам А2, трехпетельным токсинам и металлопротеиназам.

При изучении металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* впервые была обнаружена способность металлопротеиназы откреплять клетки РС12 от субстрата с последующей их кластеризацией. Взаимоотношения между клетками и компонентами экстрацеллюлярного матрикса служат основополагающим фактором в событиях, происходящих при инвазии опухоли и в механизмах ангиогенеза. Имеющиеся в литературе данные для родственных металлопротеиназ свидетельствуют, что эти белки селективно ингибировали клеточную адгезию опухолевых клеток. Таким образом, оксиагин может представлять интерес для исследований в области онкологии.

Исследование трехпетельных токсинов показало, что α -нейротоксины ядов кобр не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на клетки феохромоцитомы, в то время как цитотоксины проявляют значительную цитотоксичность. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и α -кобротоксин, показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Это необычное свойство, очевидно возникшее вследствие димеризации, наряду со способностями димеров связываться с нейрональными никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами делает их уникальными инструментами при изучении никотиновых рецепторов и исследовании лиганд-рецепторных взаимодействий.

При изучении фосфолипаз А2 змеиных ядов была установлена их способность вызывать дифференцировку клеток феохромоцитомы крысы РС12. Исследование молекулярных механизмов этого процесса показало наличие двух путей, посредством которых ФЛА2 инициируют рост нейритов. Один из них включает ферментативный гидролиз липидов и проявляется в случае ФЛА2 с высокой ферментативной активностью. Второй путь не зависит от ферментативной активности ФЛА2 и, возможно, включает участие протеинкиназ. Что касается совместимости двух путей, то мы не можем полностью исключить наличие второго механизма у ФЛА2, обладающих высокой ферментативной активностью. В практическом плане полученные для ФЛА2 данные могут являться предпосылками для более детального изучения механизмов, приводящих к дифференцировке опухолевых клеток, и послужить фундаментальной основой для создания лекарственных препаратов, направленных на подавление роста опухоли, или же использующих дифференцирующую способность ФЛА2 для лечения нейрональных повреждений или нейродегенеративных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние белков, впервые выделенных из ядов змей и принадлежащих трем различным структурно-функциональным семействам на пролиферацию клеточной линии РС12 феохромоцитомы крысы. Выявлены два основных эффекта – цитотоксический и дифференцирующий, величина которых зависела от типа и аминокислотной последовательности исследованных белков.
2. Под действием металлопротеиназы из яда кобры *Naja oxiana* клетки РС12 открепляются от подложки и экстрацеллюлярного матрикса, кластеризуются и теряют жизнеспособность.
3. Цитотоксины из яда кобры *Naja kaouthia* утрачивают цитотоксическую активность при образовании дисульфид-связанных гетеродимеров с участием альфа-кобротоксина.
4. Секретируемые фосфолипазы А2 из ядов кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje*, а также гадюк *Vipera nikolskii*, *Vipera ursinii renardi* и *Bitis arietans* стимулируют рост нейритов у недифференцированных нейроэндокринных клеток РС12, то есть приводят к их дифференцировке.
5. Сравнительный анализ цитотоксической и дифференцирующей активности фосфолипаз выявил, что из всех испытанных в работе фосфолипаз А2 наибольшей нейритогенной активностью обладает битанарин, практически не проявляющий цитотоксичности.
6. Полученные данные указывают на возможность существования двух механизмов дифференцировки, вызываемой фосфолипазами А2: для первого (вероятно, с участием лизофосфатидилхолина) необходима фосфолиполитическая активность, а второй, в котором, возможно, участвуют протеинкиназы, не зависит от ферментативной активности фосфолипаз А2.

ПубликацииСтатьи в журналах

1. **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние фосфолипаз А2 из ядов змей на рост нейритов и выживаемость клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы, Биохимия 71 (2006) 838-846.
2. Osipov A.V., Kasheverov I.E., **Makarova Y.V.**, Starkov V.G., Vorontsova O.V., Ziganshin R.K., Andreeva T.V., Serebryakova M.V., Benoit A., Hogg R.C., Bertrand D., Tsetlin V.I., Utkin Y.N., Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification, J. Biol. Chem. 283 (2008) 14571-14580.
3. Osipov A.V., Filkin S.Y., **Makarova Y.V.**, Tsetlin V.I., Utkin Y.N., A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the Naja haje cobra venom, Toxicon 55 (2010) 186-194.
4. Tsai I.H., Wang Y.M., Cheng A.C., Starkov V., Osipov A., Nikitin I., **Makarova Y.**, Ziganshin R., Utkin Y., cDNA cloning, structural, and functional analyses of venom phospholipases A₂ and a Kunitz-type protease inhibitor from steppe viper Vipera ursinii renardi. Toxicon 57 (2011) 332-341.

Патенты

1. Осипов А.В., Филькин С.Ю., **Макарова Я.В.**, Уткин Ю.Н. Прямой ингибитор тромбина, обладающий антипролиферативным действием. Патент РФ № 2369615 от 10.10.2009.

Материалы конференций

1. **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Старков В.Г., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние компонентов змеиных ядов на культуру клеток феохромоцитомы крысы. Международная конференция по физико-химической биологии, посвященная 70-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова. Москва, 4-7 октября, 2004, С. 79.
2. **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние слабого токсина на клетки культуры феохромоцитомы крысы PC12. Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты, 2005, С. 141.
3. **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Цетлин В.И., Уткин Ю.Н., Влияние фосфолипаз А2 из ядов змей на рост нейритов и выживаемость клеточной линии PC12 феохромоцитомы крысы. Рецепция и клеточная сигнализация, 2005, С. 317-320.
4. Осипов А.В., **Макарова Я.В.**, Мордвинцев Д.Ю., Поляк Я.Л., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И., Минорные компоненты яда кобр с новыми свойствами. VIII чтения, посвященные памяти академика Ю.А.Овчинникова. Москва-Пушино, 25-27 октября 2006. С. 12.
5. Utkin Y.N., Osipov A.V., **Makarova Y.V.**, Low abundant proteins in cobra venom. 15th World Congr. on Animal, Plant and Microbial toxins. Glasgow, Scotland, 23-28 July, 2006, P. 170.
6. Utkin Y., Osipov A., Starkov V., **Makarova Y.**, Tsetlin V., Post-translational modifications of three-fingered toxins. 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology, Leuven, 2008, P. 20.
7. Utkin Y.N., Osipov A.V., Starkov V.G., Mordvintsev D.Y., **Makarova Y.V.**, Tsetlin V.I., Diversification of biological activity in three-fingered toxins. 8th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins, Hanoi, 2008, P. 71.
8. Филькин С.Ю., Осипов А.В., **Макарова Я.В.**, Уткин Ю.Н., Новая антикоагулянтная фосфолипаза ПI-Nh из яда кобры, ингибирующая протеолитическую активность тромбина. XX зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва-Пушино, 2008.
9. Utkin Y. N., Osipov A. V., Starkov V. G., **Makarova Y. V.**, Tsetlin V. I., Naturally-occurring three-fingered toxins of new structural types. Abstracts of the 16th World Congress of the

International Society on Toxinology, Recife 2009, P 9.

10. Мещерякова А.В., Кашеверов И.Е., Крюкова Е.В., **Макарова Я.В.**, Осипов А.В., Уткин Ю.Н., Исследование нового трехпетельного токсина из яда *Naja kaouthia*. V Российский симпозиум Белки и пептиды, Петрозаводск, 2011, С. 284.
11. Osipov A.V., **Makarova, Y.V.**, Utkin, Y.N., An anti-proliferative effect of snake venom phospholipases A2 is unrelated to their cytotoxicity. 9th IST-Asia Pacific Meeting on Animal, Plant & Microbial Toxins, Vladivostok, 2011, P. 20.

Выражаю благодарность всем сотрудникам Лаборатории молекулярной токсикологии и Лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий ИБХ РАН за содействие и поддержку, в частности, к.х.н. А.В. Осипову за помощь в выделении белков (цитотоксинов, димерных токсинов, металлопротеиназ и фосфолипаз) и д.х.н. И.Е.Кашеверову за помощь в проведении радиолигандного анализа.

Особую благодарность выражаю своему научному руководителю профессору Уткину Ю.Н. за неоценимую помощь в выполнении данной работы, терпение и моральную поддержку. Выражаю признательность за практические советы профессору Цетлину В.И. и д.х.н. Кашеверову И.Е. Отдельное спасибо к.б.н. Киселевскому Д.Б. за помощь в обсуждении результатов работы. Благодарю также всех, кто принимал участие в обсуждении результатов работы.

Выражаю также благодарность проф. Д. Бертрану (HiQScreen, Женева) за электрофизиологические исследования димерных токсинов.

Подписано в печать 27.01.2016 г.

Формат А5

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Тираж 100 Экз. Заказ № 3796-16-КЦ

Типография ООО “МДМпринт”

(Печатный салон МДМ)

119146, г. Москва, Комсомольский пр-кт, д.28

Тел. 8-495-256-10-00

