

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова

На правах рукописи



ШИПИЛОВ

Валерий Николаевич

**ОБНАРУЖЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ
НЕРВНОЙ ТКАНИ МОЛЛЮСКА *ANODONTA CYGNEA*.**

Специальность 00.03.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2005

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии (заведующий лабораторией – доктор биологических наук, профессор Перцева М.Н.) Института эволюционной физиологии и биохимии им И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Бондарева Вера Михайловна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Пучкова Людмила Валентиновна

доктор биологических наук Парнова Римма Германовна

Ведущая организация:

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

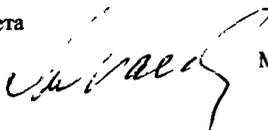
Защита состоится "29 ноября" 2005 г. в 11 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.127.01 при Институте эволюционной физиологии и
биохимии им И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЭФиБ, им И.М. Сеченова РАН

Автореферат разослан "21" октября" 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор



Маслова М.Н.

2006-4
18097

2190810

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Обнаружение инсулина, инсулиноподобных факторов роста (ИФР), релаксина и их рецепторов в ЦНС позвоночных привело к изменению представлений о происхождении и роли гормонов инсулинового суперсемейства. Однако, несмотря на идентификацию и выявление экспрессии генов инсулиноподобных пептидов (ИПП) в нервной ткани, их биологические свойства и функции изучены недостаточно. Таким образом, установление природы и роли ИПП, синтезируемых нервной тканью, остается одной из актуальных проблем современной нейроэндокринологии.

Известно, что обнаруженные в нервной ткани гормоны инсулинового суперсемейства регулируют утилизацию глюкозы по аутокринному и паракринному типу, а также осуществляют в ЦНС нейромодуляторные и нейромедиаторные функции. В их компетенцию также входят некоторые анаболические и анти-апоптотические функции, контроль процессов роста, дифференцировки нейронов и синаптогенеза, участие в регуляции пищевого поведения и ряда когнитивных функций (Schwartz et al., 1992, 2000; Schechter et al., 1999; Woods et al., 2000; Park, 2001; Schulingkamp et al., 2001; Gerozissis, 2003; Bondy, Cheng, 2004; McGowan et al., 2005). Что касается нейрокринной продукции гормонов инсулинового суперсемейства, то она показана для ИФР и релаксина, тогда как сведения, позволяющие однозначно ответить на вопрос о синтезе инсулина в ЦНС позвоночных до сих пор отсутствуют. Синтез инсулина у позвоночных показан только в эмбриональной нервной ткани (Devaskar et al., 1994).

Значительные успехи в изучении проблемы достигнуты в исследованиях на беспозвоночных, у которых основным местом синтеза ИПП является нервная ткань. С помощью методов молекулярной биологии расшифрованы гены, кодирующие ИПП, установлена первичная структура этих пептидов у представителей нескольких типов беспозвоночных, включая круглых червей, моллюсков и членистоногих (Robitzki et al., 1989; Hetru et al., 1991; Kondo et al., 1996; Smit et al., 1998; Floyd et al., 1999; Brogiolo et al., 2001; Li et al., 2003; Krieger et al., 2004). Принципиальное сходство структурной организации ИПП беспозвоночных с инсулином позволило включить эти молекулы в инсулиновое суперсемейство. Однако, в силу особенностей аминокислотной последовательности, нейропептиды беспозвоночных выделены в отдельную группу, и степень родства данных пептидов с другими членами суперсемейства инсулина еще предстоит выяснить.

Особенностью ИПП беспозвоночных является полиморфизм генов, кодирующих множественные изоформы, что практически не встречается у позвоночных. Число изоформ пептидов, синтезируемых нейронами отдельных видов может колебаться от 2 (моллюск

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 100 акт 805

Aplysia californica) до 38 (нематода *Caenorhabditis elegans*). Различия аминокислотных последовательностей между изоформами могут превышать 50 %, что предполагает разнонаправленность их действия. Немногочисленные данные свидетельствуют о проявлении метаболических и рост-стимулирующих эффектов ИПП нервной ткани беспозвоночных, однако, регуляторная роль большинства известных пептидов во многом остается не выясненной (Claeys et al., 2002).

В данной работе впервые выявлена локализация инсулиноподобных пептидов в ганглиях пресноводного двустворчатого моллюска *Anodonta cygnea*, показана способность нейронов к их синтезу, проведены выделение и очистка из ганглиев пептидов, обозначенных нами как родственные инсулину пептиды (РИП), оценена способность полученных РИП связываться с рецепторами инсулина и ИФР-I, а также влияние пептидов на активность аденилатциклазной сигнальной системы.

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы явилось обнаружение и характеристика родственных инсулину пептидов в нервной системе моллюска *Anodonta cygnea*

В соответствии с этим в конкретные задачи входило:

1. Установить локализацию клеток, синтезирующих родственные инсулину пептиды в ганглиях с помощью иммуногистохимического метода и показать присутствие мРНК, кодирующих пептиды моллюска.
2. Выделить с помощью ионообменной и высокоэффективной жидкостной хроматографий родственные инсулину пептиды из трех видов нервных ганглиев моллюска.
3. Дать сравнительную характеристику функциональных свойств выделенных пептидов, оценив их способность связываться с рецепторами инсулина и ИФР-I тканей позвоночных, а также по регуляторному эффекту пептидов на внутриклеточный аденилатциклазный сигнальный каскад.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обнаружение в нервных ганглиях моллюска *A. cygnea* клеток, содержащих пептиды, взаимодействующие с антителами к инсулину позвоночных, позволяет констатировать, что в нейронах этого вида присутствуют субстанции родственные инсулину.
2. Выделение РИП из ганглиев *A. cygnea* по оригинальной схеме получения инсулина и последующая ВЭЖХ очистка подтверждает присутствие в нервной ткани этого вида моллюска пептидов, сходных с инсулинами позвоночных.

3. Оценка способности РИП, полученных из ганглиев *A. cygnea*, взаимодействовать с рецепторами инсулина и ИФР-I в специфических радиолигандных тест-системах дает основание считать исследуемые пептиды функционально близкими к гормонам инсулинового суперсемейства. В тоже время низкое относительное сродство РИП моллюска к обоим типам рецепторов свидетельствует о значительных отличиях их структур от стандартных инсулина свиньи и ИФР-I человека.

4. Способность РИП моллюска стимулировать активность аденилатциклазы и ГТФ-связывающей активности G-белков сходным с инсулином и ИФР-I образом, указывает на возможность осуществления их регуляторных эффектов через аденилатциклазную сигнальную систему.

Научная новизна

1. Впервые выявлена локализация родственных инсулину пептидов в нервной системе моллюска *A. cygnea*

2. Впервые из нервной ткани представителя беспозвоночных, двусторчатого моллюска *A. cygnea*, выделены и очищены родственные инсулину пептиды.

3. Впервые проведена оценка биологических и функциональных свойств родственных инсулину пептидов, присутствующих в клетках ганглиев моллюска *A. cygnea*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявление в нервной ткани моллюска *A. cygnea* пептидов, обладающих свойствами, как инсулина, так и ИФР-I, является вкладом в развитие представлений об эндокринной функции нервной ткани и представляется важным для понимания генезиса и эволюции регуляторных систем, продуцирующих инсулиноподобные пептиды.

Характеристика биологических свойств РИП, полученных из ганглиев *A. cygnea* в тест-системах млекопитающих позволяет приблизиться как к пониманию природы и роли этих субстанций, так и проиллюстрировать структурно-функциональную дивергенцию гормонов суперсемейства инсулина в филогенезе.

Обнаружение у моллюсков пептидов, обладающих свойствами инсулина и ИФР-I, в практическом плане может быть использовано для гормональной стимуляции роста и развития в процессе выращивания марикультур беспозвоночных.

Апробация работы

Результаты исследования доложены на Седьмой региональной конференции международного общества нейробиологии беспозвоночных (Калининград-Светлогорск-

Отрадное, 2003); Международной научной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов (Петрозаводск, 2004); Двадцать второй конференции европейских сравнительных эндокринологов (Уппсала, Швеция, 2004); Седьмой Всероссийской конференции «Нейроэндокринология-2005» (С-Петербург, 2005).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей в рецензируемых российских и иностранных журналах и 5 тезисов докладов.

Личный вклад автора

Все экспериментальные данные, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов, обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 105 страницах, включая 20 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 212 ссылок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные - двусторчатые пресноводные моллюски *Anodonta cygnea* и крысы линии Вистар. Исследования проводили на нервной и гладкомышечной ткани моллюска, скелетных мышцах, нервной ткани и печени крысы.

Выявление инсулин-иммунореактивных клеток в ганглиях моллюска иммуноцитохимическим методом. В исследованиях использовали стандартную гистологическую обработку ганглиев. Далее изготавливали серии чередующихся парафиновых срезов, сделанных во фронтальной плоскости, толщиной 6 мкм.

Выявление инсулин-иммунореактивных клеток проводили с помощью непрямого иммуноферментного метода (Polak, Van Noorden, 1983). В качестве первичных антител использовали поликлональную антиинсулиновую сыворотку, полученную после иммунизации морских свинок кристаллическим инсулином горбуши (*O gorbusha*) Вторичные антитела - стандартный набор антител к иммуноглобулинам морской свинки, конъюгированных с пероксидазой.

Выявление присутствия мРНК, кодирующих родственные инсулину пептиды моллюска методом ОТ-ПЦР. Для конструирования праймеров использовали известные нуклеотидные последовательности мРНК, кодирующие ИПП беспозвоночных, поиск

которых осуществляли в базе данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. Найденные последовательности выравнивали с помощью программы Clustal W для выявления в них консервативных участков. В результате в качестве шаблона использовали последовательности мРНК, кодирующие ИПП моллюска-прудовика *Lymnaea stagnalis*, на основе которых были сконструированы три пары праймеров. Амплификацию проводили методом обратной транскрипции совмещенной с ПЦР (ОТ-ПЦР). В экспериментах использовали кДНК, полученные в реакции обратной транскрипции на препаратах тотальной РНК, которые выделяли раздельно из каждого вида нервных ганглиев. На полученной из каждого вида ганглиев РНК проводили ОТ-ПЦР. Образующиеся продукты подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, сканировали и обрабатывали с помощью программы ACD See 5.0.

Родственные инсулину пептиды выделяли из ганглиев моллюска по схеме, разработанной в лаборатории для получения инсулинов из поджелудочной железы и внепанкреатических тканей позвоночных (Русаков, Бондарева, 1979; Бондарева и др., 1988). Грубую очистку препарата осуществляли ионообменной хроматографией на макропористом сульфокатионите КУ-23 в H^+ форме. Дальнейшую очистку проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Диасорб $C_{16}T$. Значимые пептидные пики подвергали рехроматографии в аналогичных условиях.

Получение материала для тестирования биологических свойств РИП моллюска

Фракцию плазматических мембран печени крыс получали по методу Невилла с некоторыми модификациями (Neville, 1968). Гетерогенную фракцию клеточных мембран мозга крыс получали по методу Хавранковой (Navrankova et al., 1978). Фракцию плазматических мембран ганглиев выделяли по методу Hajos (Hajos, 1975). Сарколеммальную фракцию мышц ноги моллюска получали по методу Kidwai (Kidwai et al., 1973) с изменениями.

Определения специфического связывания ^{125}I -инсулина и ^{125}I -ИФР-I. Меченые инсулин и ИФР-I получали хлораминовым методом с очисткой на целлюлозной колонке (Yalow, Berson, 1960). Удельная активность меченых гормонов составляла 160-180 мкКи/мкг. Специфическое связывание ^{125}I -инсулина и ^{125}I -ИФР-I с соответствующими гормонам рецепторами анализировали методом конкурентного вытеснения меченых пептидов немечеными. Для этого использовали радиорецепторные тест-системы: 1) на основе ^{125}I -инсулина свиньи и обогащенной рецепторами инсулина фракции плазматических мембран печени крыс; 2) на основе ^{125}I -ИФР-I человека и обогащенной рецепторами ИФР-I фракции клеточных мембран мозга крыс. Меченые инсулин или ИФР-I инкубировали с соответствующим материалом в присутствии немеченых лигандов в возрастающих концентрациях (0.1-1000 нг/мл). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10

мкг/мл немеченого инсулина или ИФР-I. Смесь инкубировали 22 ч при 4⁰ С, затем связанные с рецепторами ¹²⁵I-инсулин или ¹²⁵I-ИФР-I отделяли центрифугированием, после чего считали радиоактивность проб. Величину относительного сродства РИП к рецепторам рассчитывали, исходя из IC₅₀, оцениваемой по подавлению 50 % связывания меченого гормона исследуемым пептидом в сравнении со значением IC₅₀ стандартных инсулина и ИФР-I, величину которой принимали за 100 %.

Определение активности аденилатциклазы и ГТФ-связывания G-белков. Определение активности АЦ проводили по методу Salomon и соавт. (Salomon et al., 1974), которое заключалось в измерении образующегося ³²P сАМФ за 1 мин на 1 мг белка. В экспериментах по определению типа G-белков проводили преинкубацию фракций мембран с искусственно синтезированными пептидами, соответствующими С-концевым участкам α_s- и α₂-субъединиц G-белков млекопитающих. Определение общей ГТФ-связывающей активности G-белков проводили по методу Panchenko (Panchenko et al., 1987) и McIntire (McIntire et al., 2001). Специфическую ГТФ-связывающую активность определяли как разность между связыванием меченого [8-³H]Gpp[NH]p в пробе в присутствии и отсутствии ГТФ.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью программ Origin 7.0 и ANOVA, используя t-критерий Стьюдента для малых выборок. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего из нескольких независимых экспериментов. Различия между контролем и опытными пробами оценивали как достоверные при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Иммуноцитохимическая идентификация в ганглиях моллюска нейронов, содержащих пептиды родственные инсулину.

Иммуногистохимическое окрашивание срезов ганглиев моллюска с помощью антиинсулиновой сыворотки выявило присутствие инсулин-иммунореактивных клеток во всех видах ганглиев (Рис. 1). Наиболее интенсивное окрашивание наблюдалось в корковом слое ганглиев, который соответствует телам нейронов. Более слабое окрашивание обнаружено во внутреннем слое (нейропиль), который соответствует аксонам нейронов. Расположение инсулин-иммунореактивных клеток не имело определенной упорядоченности, выявленные клетки были рассеяны по всему корковому слою, не образуя обособленных скоплений.

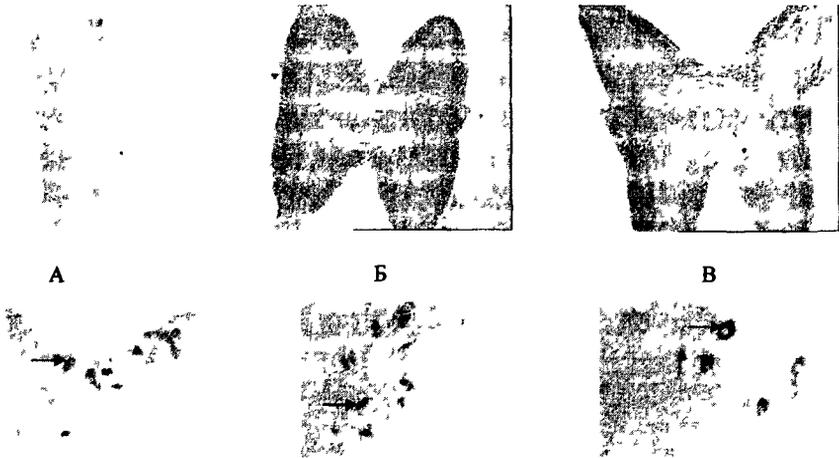


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание ганглиев *A. cygnea* антиинсулиновой сывороткой: А-преброплевральные, Б-педальные, В-висцеропариетальные ганглии (стрелками обозначен корковый слой, включающий клетки, содержащие инсулин-иммунореактивные пептиды).

Таким образом, в ганглиях *A. cygnea* было показано присутствие инсулин-иммунореактивных пептидов, имеющих общие иммунологические детерминанты с инсулином. Отсутствие упорядоченности расположения клеток, содержащих инсулиноподобные пептиды, характерные для более высокоорганизованных беспозвоночных отражает одну из ранних стадий развития в эволюции системы продуцирующей ИПП.

2. Амплификация участков мРНК, предположительно кодирующих РИП моллюска.

С целью подтверждения способности ганглиев моллюска к синтезу РИП нами была проведена амплификация мРНК, кодирующих РИП методом ОТ-ПЦР. Поскольку структура генов кодирующих РИП *A. cygnea* неизвестна, то для конструирования праймеров, использовали компьютерный поиск известных последовательностей кодирующих ИПП беспозвоночных (база данных GeneBank). В найденных последовательностях не содержалось протяженных консервативных участков, пригодных к использованию в качестве праймеров. Поэтому были использованы последовательности мРНК инсулиноподобных пептидов моллюска *L. stagnalis*, вида филогенетически наиболее близкого к исследуемому. В результате были сконструированы три пары праймеров, перекрывающие область нуклеотидной последовательности мРНК моллюска *L. stagnalis*, включающей часть В-домена, С-, А-домены и предполагаемый полиадениловый «хвост» (Табл.1).

Таблица 1. Последовательности праймеров, перекрывающих участки мРНК предположительно кодирующих инсулиноподобные пептиды моллюска *Anodonta cygnea* и длина полученных ПЦР продуктов.

№ пары	Нуклеотидные последовательности верхнего и нижнего праймеров соответственно	Длина продуктов ПЦР, п.н.		t _{отжига} , °С
		<i>L. stagnalis</i> *	<i>A. cygnea</i> **	
1.	5'CATCCCCGTGGCATTGTGGC3' 5'GCAGCATTCACACACTAAGTTGG 3'	245	-	65.0
2.	5'CCAACCTTAGTGTGTGAATGCTGC 3' 5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	167	~700 ~400	50.0
3.	5'CATCCCCGTGGCATTGTGGC 3' 5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	390	~500 ~400	50.0

* -для моллюска *L. stagnalis* приведена теоретически рассчитанная длина ПЦР-продуктов.

** -для моллюска *A. cygnea* приведена длина экспериментально полученных ПЦР-продуктов.

Аmplификация участков мРНК моллюска *A. cygnea*, предположительно кодирующих РИП, выявила по два ПЦР-продукта длиной около 700 и 400 пар нуклеотидов в цереброплевральных и педальных ганглиях при использовании второй пары праймеров, и по два фрагмента длиной около 500 и 400 п.н. в тех же видах ганглиев при использовании третьей пары, тогда как в висцеропариетальных ганглиях амплификат отсутствовал. Первая пара праймеров не выявила ПЦР-продуктов ни в одном из видов ганглиев (Рис. 2).

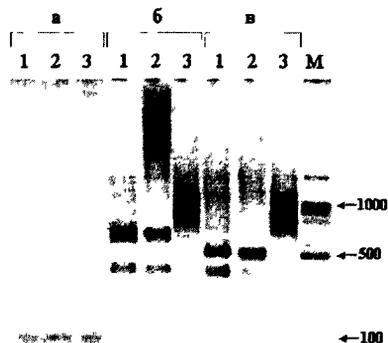


Рис. 2. Амплификация участков мРНК, предположительно кодирующих инсулиноподобные пептиды моллюска *A. cygnea* цереброплевральных (1), педальных (2) и висцеропариетальных (3) ганглиев с использованием трех пар праймеров (а - № 1, б - № 2, в - № 3).

М- ДНК маркеры – от 100 до 1000 пар нуклеотидов (п.н.) +1500 п.н.

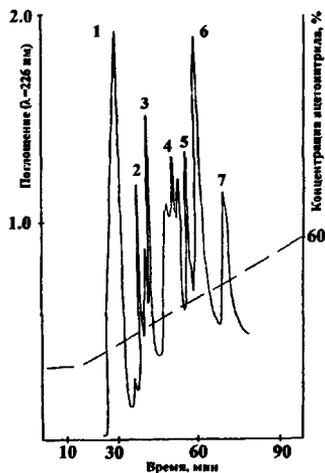
а – неспецифический отжиг праймеров (~100 п.н.).

Обнаружение мРНК, предположительно кодирующих РИП, свидетельствует о наличии достаточно протяженных участков нуклеотидных последовательностей мРНК, кодирующих ИПП, консервативных среди разных классов моллюсков. С другой стороны отсутствие амплификата в висцеропаренхимальных ганглиях может указывать на значительные различия структуры РИП, синтезируемых в этом виде ганглиев.

3. Выделение и очистка родственных инсулину пептидов моллюска.

Родственные инсулину пептиды были отдельно выделены из каждого вида ганглиев, собранных от 4080 моллюсков. В результате ионообменной хроматографии кислотнo-этаноловых экстрактов ткани на колонке с сульфокатионитом КУ-23 в условиях десорбции инсулина в каждом из препаратов были получены четкий единичный белковый пик.

Дальнейшую очистку выделенных инсулиноподобных субстанций проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате ВЭЖХ-очистки в препарате из цереброплевральных ганглиев было идентифицировано семь мажорных пиков, различающихся по времени удержания на обратнo-фазном сорбенте в градиенте ацетонитрила и обозначенных как - РИП1 – РИП7 (Рис. 3.).



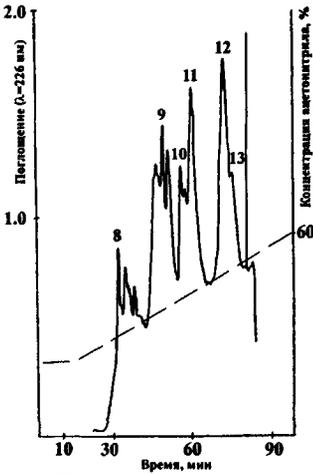
Инсулин и пептиды моллюска	% CH ₃ CN в зоне выхода пептида
Инсулин	39.00-39.50
РИП моллюска	
1	32.60-33.57
2	34.66-36.97
3	37.56-38.09
4	38.09-39.47
5	39.97-40.65
6	41.06-42.47
7	45.47-47.60

Рис. 3. Профили элюции РИП из цереброплевральных ганглиев моллюска *A. sygnea*, полученные с использованием ВЭЖХ (колонка Диасорб С₁₈Т). Скорость элюции 1 мл/мин. По оси абсцисс – время элюции, мин; по оси ординат – поглощение при длине волны 226 нм.

В качестве физико-химической характеристики пептидов были использованы два, тождественных по сути, критерия - время удержания на колонке и гидрофобность (% концентрации ацетонитрила). В соответствии с этим гидрофобность РИП1 составила 32.6 %,

РИП7 – 47 %. Для стандартного инсулина аналогичная величина составила 39 %.

Очистка препарата из печальных ганглиев выявила 6 мажорных фракций, обозначенных РИП8 - РИП13, их гидрофобность варьировала от 30.5 % до 49.4 % (Рис. 4).

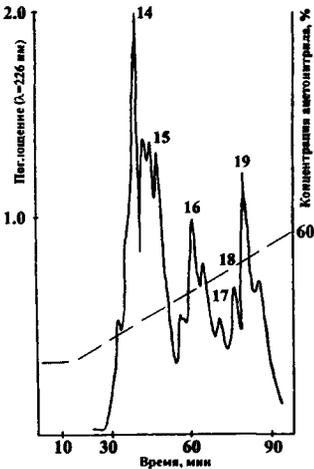


Инсулин и пептиды моллюска	% CH_3CN в зоне выхода пептида
Инсулин	39.00-39.50
РИП моллюска	
8	30,43-31,03
9	34,93-37,00
10	39,59-40,47
11	41,03-43,00
12	45,11-47,50
13	47,53-49,42

Рис. 4. Профили элюции РИП из печальных ганглиев моллюска *A. sугnea*, полученные с использованием ВЭЖХ (колонка Диасорб C_{16}T). Скорость элюции 1 мл/мин.

По оси абсцисс – время элюции, мин; по оси ординат – поглощение при длине волны 226 нм.

ВЭЖХ-очистка препарата из висцеропариетальных ганглиев выявила 6 фракций, РИП14 – РИП19 (Рис. 5). Показатель гидрофобности варьировал от 36.1 % до 50 %.



Инсулин и пептиды моллюска	% CH_3CN в зоне выхода пептида
Инсулин	39.00-39.50
РИП моллюска	
14	36.13-39.00
15	39.00-40.35
16	42.00-43.58
17	45.50-46.95
18	46.95-49.10
19	49.10-50.00

Рис.5. Профиль элюции инсулиноподобных пептидов из висцеропариетальных ганглиев моллюска *A. sугnea*, полученный с использованием ВЭЖХ (колонка Диасорб C_{16}T).

Таким образом, использование двухступенчатой ВЭЖХ позволило получить из ганглиев моллюска 19 пептидных изоформ высокой степени очистки. Широкий диапазон гидрофобности выделенных РИП относительно инсулина предполагает различия их первичных структур. Сравнение зон выхода РИП из трех видов ганглиев выявило, что отдельные пептиды имели сходные зоны выхода, что предполагает возможность синтеза одних и тех же пептидов в разных видах ганглиев (Рис. 6).

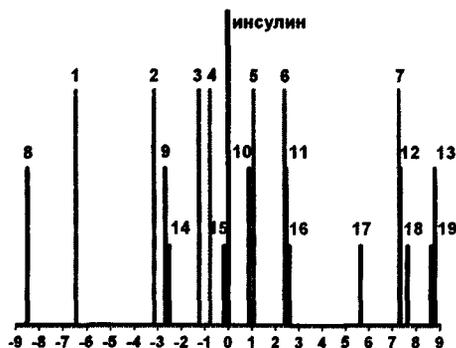
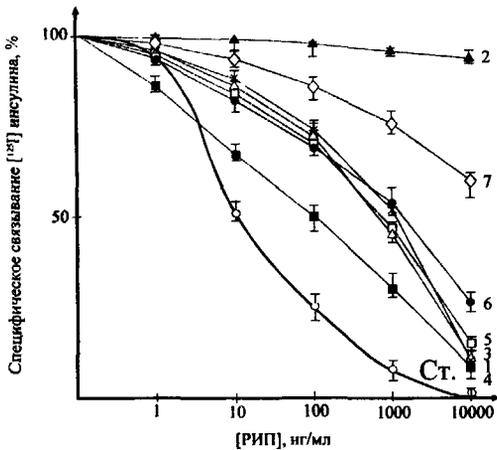


Рис. 6. Зоны выхода отдельных РИП цереброплевральных (1-7), педальных (8-13) и висцеропариетальных (14-19) ганглиев относительно зоны выхода инсулина, принятой за 0. Одна единица по оси абсцисс равна изменению концентрации ацетонитрила на 1 %.

4. Оценка способности РИП моллюска взаимодействовать с рецепторами инсулина и ИФР-I.

Для функциональной характеристики полученные РИП были протестированы в специфических радиорецепторных системах инсулина и ИФР-I, что могло указывать на проявление пептидами метаболических или рост-стимулирующей активностей.

В инсулиновой системе шесть из семи РИП полученных из цереброплевральных ганглиев взаимодействовали с рецептором инсулина плазматических мембран печени крыс. Ход кривых конкурентного вытеснения РИП указывает на способность данных пептидных изоформ связываться с рецептором в дозозависимой манере (Рис. 7). Среди анализированных пептидов наивысшим средством к инсулиновому рецептору обладал РИП4; величина его IC_{50} (17 нМ) составила 11.8 % относительно свиного гормона, величина IC_{50} которого равнялась 2 нМ. Величина IC_{50} РИП1 и РИП6 составила 330 и 420 нМ, соответственно. РИП3 и РИП5 имели одинаковые значения IC_{50} – 130 нМ. Изоформа РИП2 не проявила способности ингибировать связывание меченого гормона даже в концентрациях более 10мкг/мл, а те же количества РИП7 вытесняли менее 50 % связанного с рецептором гормона.

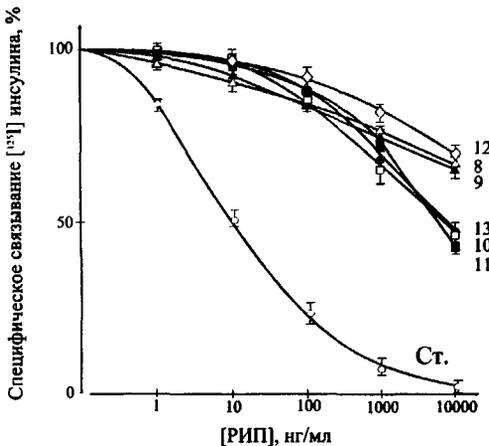


	IC ₅₀ , (нМ)	Относительное средство, (%)
Инсулин	2	100.0
РИП моллюска		
1	330	0.6
2	.*	.*
3	130	1.6
4	17	11.8
5	130	1.6
6	420	0.5
7	>1700	–**

Рис. 7. Кривые конкурентного вытеснения ¹²⁵I-инсулина пептидами из цереброплевральных ганглиев моллюска *A. cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ¹²⁵I-инсулина, % от максимума.

РИП моллюска из педальных ганглиев (РИП8-РИП13) проявили способность к взаимодействию с рецептором инсулина (Рис. 8). Ход кривых конкурентного вытеснения указывает на слабое средство пептидных изоформ к этому рецептору.



	IC ₅₀ , (нМ)	Относительное средство, (%)
Инсулин	2	100.0
РИП моллюска		
8	>1666	–**
9	>1666	–**
10	1166	0.17
11	833	0.24
12	>1666	–**
13	1333	0.15

Рис. 8. Кривые конкурентного вытеснения ¹²⁵I-инсулина пептидами из педальных ганглиев моллюска *Anodonta cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ¹²⁵I-инсулина, % от максимума.

В данной тест-системе величина IC₅₀ для РИП10 составила 1167 нМ, для РИП13 – 1333 нМ. Более высоким средством обладал РИП11, аффинность которого (833 нМ)

составила 0.24 % величины IC_{50} стандартного инсулина. РИП8, РИП9, РИП12 при максимальной концентрации 10^4 нг/мл подавляли менее 50 % связывания с рецептором меченого гормона.

Тестирование РИП из висцеропариеальных ганглиев моллюска (РИП14-РИП19) выявило их чрезвычайно слабое сродство к рецептору инсулина плазматических мембран печени крыс (Рис 9). В данной тест-системе пять из шести РИП при максимальной концентрации подавляли менее 50 % связывания меченого гормона с рецептором. Величина IC_{50} была установлена только для РИП16 и равнялась 1700 нМ.

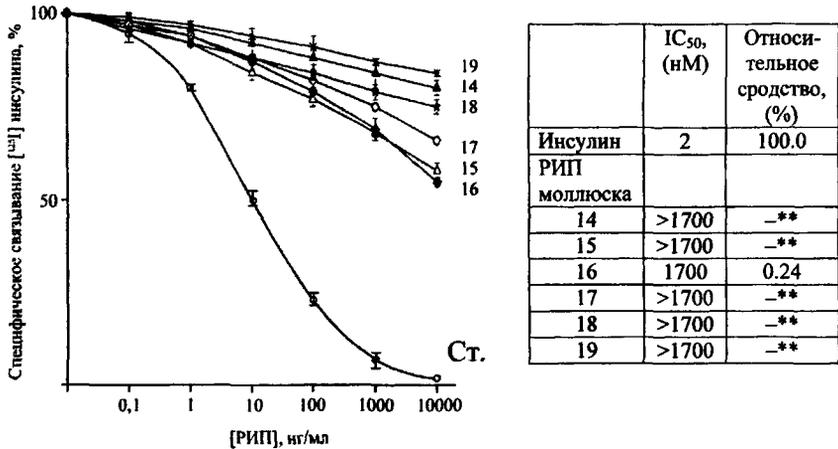
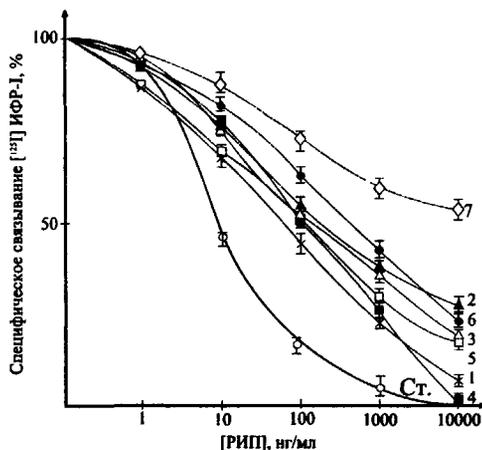


Рис. 9. Кривые конкурентного вытеснения ^{125}I -инсулина пептидами из висцеропариеальных ганглиев моллюска *A. cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ^{125}I -инсулина, % от максимума.

В радиорецепторной системе, специфичной для ИФР-I, каждый из семи пептидов цереброплевральных ганглиев проявил способность связываться с рецептором ИФР-I (Рис 10). При этом, исследуемые РИП обнаружили разную активность. Так, в сравнении с величиной IC_{50} стандартного ИФР-I человека 2 нМ, значение IC_{50} для РИП7 и РИП6 равнялось 500 нМ и 133 нМ, соответственно. Величины относительного сродства к рецептору ИФР-I изоформ РИП2 и РИП3 практически не различались (50 нМ и 83 нМ). Равновысокая конкурирующая способность (IC_{50} 17 нМ) отмечена для РИП1, РИП4 и РИП5.

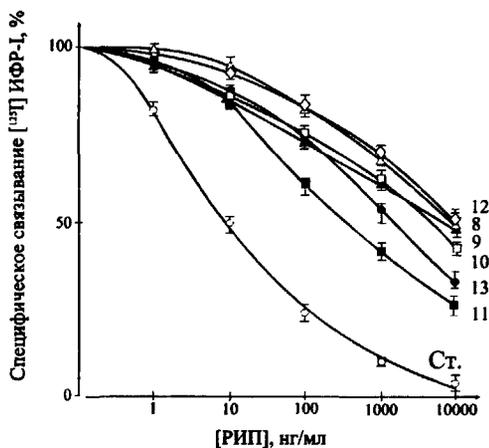


	IC ₅₀ (нМ)	Относительное средство, (%)
ИФР-I	2	100.0
РИП моллюска		
1	17	11.8
2	50	4.0
3	83	2.4
4	17	11.8
5	17	11.8
6	133	1.5
7	>500	0.4

Рис. 10. Кривые конкурентного вытеснения ¹²⁵I-ИФР-I пептидами из цереброплевральных ганглиев моллюска *Anodonta cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ¹²⁵I-ИФР-I, % от максимума.

Пептиды из педальных ганглиев также проявили активность в конкурировании с ¹²⁵I-ИФР-I человека за связывание с рецепторами ИФР-I клеточных мембран мозга крыс (Рис. 11). В этой системе величина IC₅₀ для РИП8 и РИП12 составила 1666 нМ, РИП9 – 1500 нМ, РИП10 – 833 нМ, РИП13 – 500 нМ.



	IC ₅₀ (нМ)	Относительное средство, (%)
ИФР-I	2	100.0
РИП моллюска		
8	1666	0.12
9	1500	0.13
10	833	0.24
11	83	2.4
12	1666	0.12
13	500	0.4

Рис. 11. Кривые конкурентного вытеснения ¹²⁵I-ИФР-I пептидами из педальных ганглиев моллюска *A. cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ¹²⁵I-ИФР-I, % от максимума.

Наибольшим сродством к рецептору ИФР-I обладал РИП11; величина его IC_{50} была равна 83 нМ, что составило 2,4 % от значения IC_{50} стандартного ИФР-I.

Тестирование пептидов из висцеропарияльных ганглиев (РИП14-РИП19) в системе ИФР-I выявило их слабое взаимодействие с рецепторами ИФР-I (Рис. 12).

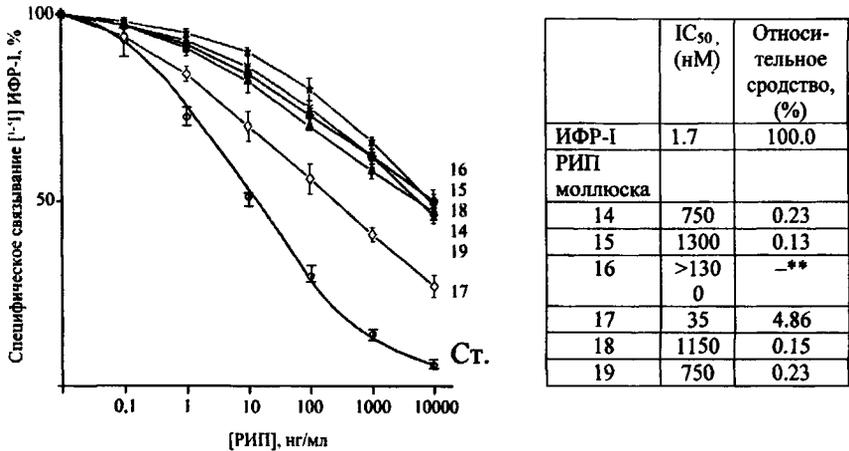


Рис. 12. Кривые конкурентного вытеснения ^{125}I -ИФР-I пептидами из висцеропарияльных ганглиев моллюска *Anodonta cygnea*.

По оси абсцисс – концентрация родственных инсулину пептидов (РИП), нг/мл; по оси ординат – специфическое связывание ^{125}I -ИФР-I, % от максимума.

Наибольшим сродством обладал РИП17 – IC_{50} 35 нМ, что составило 4.86 % от величины IC_{50} стандартного ИФР-I (1.7 нМ). Величина IC_{50} для РИП15 составила 1300 нМ, РИП18 – 1150 нМ, РИП14 и РИП19 – 750 нМ. Изоформа РИП16 при максимальной концентрации вытесняла менее 50% меченого гормона.

Таким образом, выявленная в радиолигандном анализе способность пептидов моллюска специфически связываться с рецепторами инсулина и ИФР-I, указывает на функциональное родство РИП гормонам инсулинового суперсемейства и свидетельствует о возможном проявлении пептидами ростовой и метаболической активности. Ход дозозависимых кривых свидетельствует о принципиально сходном характере действия исследуемых нейропептидов моллюска в обеих тест-системах, но, в тоже время, свидетельствует о разной возможности взаимодействия отдельных изоформ с рецепторами каждой из систем. Существенно, что 15 из 19 изоформ РИП имели более высокое сродство к рецептору ИФР-I, что может указывать на преобладание рост-стимулирующих эффектов этих пептидов (Рис 13).

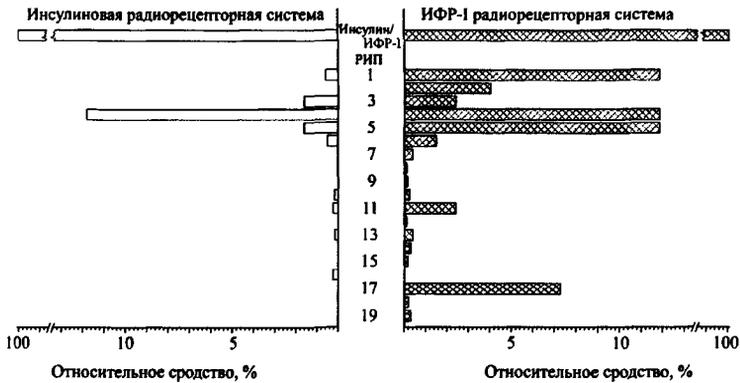


Рис. 13. Относительное сродство РИП моллюска к рецепторам инсулина и ИФР-I.

Среди протестированных пептидов РИП4 и РИП10 обладали практически одинаковым сродством к рецепторам инсулина и ИФР-I («функциональные гибриды»), что предполагает близость строения активного центра этих молекул обоим типам рецепторов. При сравнении величин сродства РИП из разных видов ганглиев отмечается снижение аффинности к обоим типам рецепторов от пептидов цереброплевральных ганглиев к пептидам висцеропаретальных ганглиев, что предполагает различную функциональную роль ганглиев в контролируемых РИП процессах. Сравнение величин относительного сродства РИП выделенных из разных ганглиев и сопоставление их с зонами выхода пептидов относительно инсулина выявило сходство отдельных изоформ по данным параметрам. Эти данные указывают на то, что отдельные РИП могут синтезироваться в разных видах ганглиев. Однако однозначно ответить на этот вопрос можно, лишь проведя секвенирование каждого из таких пептидов.

5. Влияние РИП моллюска на активность аденилатциклазы и ГТФ-связывание в мышечной и нервной тканях.

Для характеристики действия нейропептидов моллюска на внутриклеточные сигнальные каскады была проведена оценка регуляторного влияния РИП1 и РИП7 цереброплевральных ганглиев на функциональную активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы (АЦ и G-белки) в нервной ткани, гладких мышцах моллюска и скелетных мышцах крысы в сравнении со стандартными инсулином и ИФР-I.

РИП1 и РИП7 дозозависимо стимулировали активность АЦ во фракции плазматических мембран гладких мышц моллюска (Рис. 14).

Наиболее мощным активатором АЦ в мышцах моллюска оказался РИП1, тогда как РИП7 по своей эффективности лишь незначительно превосходил инсулин и ИФР-I. В нервной ткани пептиды моллюска уступали по своей активности инсулину и ИФР-I.

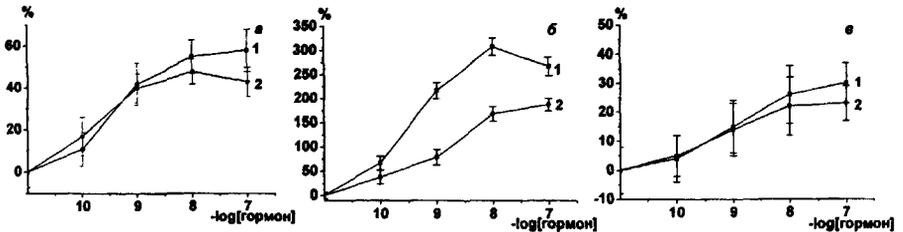


Рис. 14. Стимулирующий эффект РИП1 - (1) и РИП7 - (2) на активность АЦ во фракциях плазматических мембран ганглиев (а) и гладких мышц моллюска (б), а также скелетных мышц крысы (в). По вертикали – стимулирующий эффект РИП на активность АЦ (%); по горизонтали – отрицательный логарифм концентрации гормона.

Базальная активность АЦ во фракциях плазматических мембран ганглиев моллюска, гладких мышц моллюска и скелетных мышц крысы составляла 63.8 ± 5.0 , 28.5 ± 1.2 и 20.2 ± 3.8 пмоль САМР за 1 мин на 1 мг белка.

При этом действие обоих РИП, инсулина и ИФР-I на АЦ в ганглиях было менее выраженным, чем в мышцах моллюска. Влияние РИП на активность АЦ в скелетных мышцах крысы практически не проявлялось, в то время как инсулин и ИФР-I оказывали значительный стимулирующий эффект (Табл. 2).

Таблица 2. Влияние РИП, инсулина и ИФР-I на активность АЦ в мембранах нервных ганглиев и гладких мышц моллюска, а также скелетных мышц крысы.

Воздействие	Активность АЦ, пмоль САМР за 1 мин на 1 мг белка		
	Нервные ганглии моллюска	Гладкие мышцы моллюска	Скелетные мышцы крысы
Контроль	68.1 ± 4.2 (100)	26.9 ± 1.6 (100)	18.8 ± 1.7 (100)
РИП1, 10^{-8} М	101.3 ± 7.1 (149)	113.1 ± 8.5 (420)	23.0 ± 2.1 (122)
РИП7, 10^{-8} М	97.9 ± 6.0 (144)	70.2 ± 5.1 (261)	22.3 ± 1.6 (119)
Инсулин, 10^{-8} М	124.0 ± 8.4 (182)	65.2 ± 4.0 (242)	38.6 ± 2.2 (205)
ИФР-I, 10^{-8} М	131.2 ± 9.1 (193)	61.2 ± 3.9 (228)	34.1 ± 3.0 (181)

Примечание. Контроль – базальная активность АЦ. Цифры в скобках – активность АЦ в % (базальная активность фермента принята за 100 %). Все значения активности АЦ достоверно отличаются от контрольных $p < 0.05$ ($n = 6$).

Для определения типа G-белков, опосредующих стимуляцию АЦ пептидами моллюска были использованы С-концевые пептиды α -субъединиц гетеротримерных G-белков, селективно разобщающих функциональное сопряжение между рецептором и G-белком. Стимулирующий эффект РИП1 на АЦ был чувствителен к действию С-концевого

пептида 385-394 α_s -субъединицы G-белка, который способен нарушать функциональное сопряжение между активированным гормоном рецептором серпантинного типа и G_s -белком. В присутствии 10^{-5} М пептида эффект РИП1 снижался в гладких мышцах более чем на 50 %, в ганглиях – на 35 %. Стимулирующий эффект РИП7 в гладких мышцах заметно снижался только в присутствии сравнительно высоких концентраций пептида 385-394, а в ганглиях практически не менялся. Эффекты инсулина и ИФР-I в присутствии пептида 385-394 во всем диапазоне концентраций менялись слабо. Пептид 346-355 α_{12} -субъединицы G-белка, нарушающий функциональное сопряжение между рецептором серпантинного типа и $G_{i_{1,2}}$ -белком, не влиял на стимуляцию АЦ ни одним из пептидов (Рис. 15).

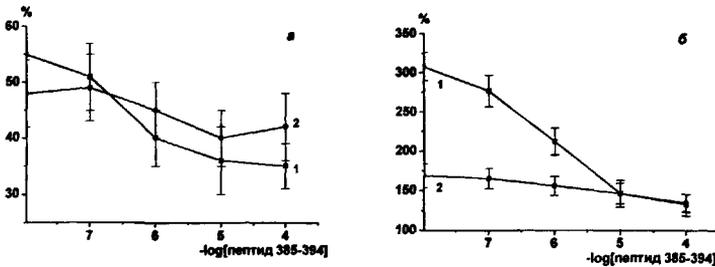
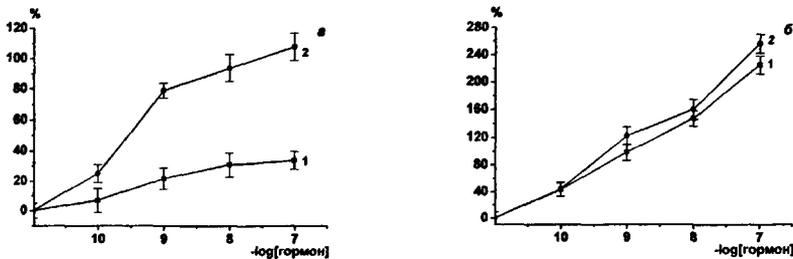


Рис. 15. Влияние пептида 385-394 α_s (10^{-7} - 10^{-4} М) на стимуляцию пептидами РИП1 – (1) и РИП7 – (2) (10^{-8} М) активности АЦ в мембранах нервных ганглиев (а) и гладких мышц моллюска (б). По вертикали – стимулирующий эффект РИП на активность АЦ (%); по горизонтали – отрицательный логарифм концентрации гормона.

Оба нейропептида, также как инсулин и ИФР-I, дозозависимо повышали уровень ГТФ-связывания в мышцах моллюска и, в меньшей степени в ганглиях (Рис. 16).



Стимуляция РИП1 – (а) и РИП7 – (б) (10^{-10} - 10^{-7} М) ГТФ-связывания во фракциях плазматических мембран ганглиев и гладких мышц моллюска. По вертикали – стимулирующий эффект РИП на ГТФ-связывание (%); по горизонтали – отрицательный логарифм концентрации гормона.

Стимуляция ГТФ-связывания РИП1 и РИП7 в значительной степени блокировалась сурамином (селективным блокатором гетеротримерных G-белков) (Рис.17).

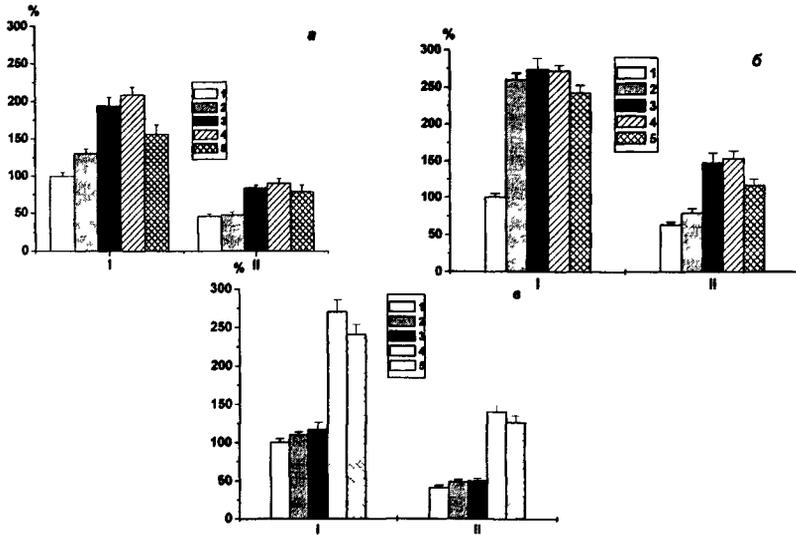


Рис 17. Стимуляция РИП1, РИП7, инсулина и ИФР-I (10^{-8} М) ГТФ-связывания в мембранах а) нервных ганглиев и б) гладких мышц моллюска, а также в) скелетных мышц крысы в отсутствие (I) и в присутствии (II) ингибитора гетеротримерных G-белков сурамина (10^{-5} М).

1 – контроль; 2 – РИП1; 3 – РИП7; 4 – инсулин; 5 – ИФР-I. По вертикали – ГТФ-связывание в процентах (ГТФ-связывание в контроле принято за 100 %).

Однако в гладких мышцах моллюска стимуляция ГТФ-связывания РИП7, была несколько менее чувствительна к этому специфичному ингибитору гетеротримерных G-белков, чем при использовании РИП1.

Способность РИП стимулировать АЦ и ГТФ-связывание свидетельствует о возможности передачи сигнала, закодированного в структуре РИП, на сигнальные каскады. Данные по стимуляции АЦ в различных тканях указывают на то, что РИП обладают тканеспецифичностью действия, а также что нервная ткань не является основной мишенью действия РИП. Суммируя данные по использованию синтетических пептидов и сурамина можно предположить, что действие РИП на АЦ может реализовываться через рецептор, функционально сопряженный с гетеротримерным G-белком стимулирующего типа, как это происходит в случае сопряженных с G_s -белками рецепторов серпантинного типа. В то же время в гладких мышцах моллюска стимулирующее действие РИП7 менее чувствительно к

сурамину, в сравнении с РИП1. Это может свидетельствовать о том, что РИП7 активирует также ГТФ-связывающие белки, не являющиеся гетеротримерными и не участвующие в регуляции функциональной активности АЦ.

Выбор АЦ системы для оценки функциональной активности изучаемых пептидов моллюска был основан на открытом в лаборатории АЦ сигнального механизма действия инсулина и ИФР-I, который включает следующую сигнальную цепь: рецептор-тирозинкиназа->Gi-белок-> фосфатидилинозитол-3-киназа->протеинкиназа C zeta-> Gs-белок->аденилатциклаза (Pertseva et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью настоящей работы было установить локализацию, выделить и охарактеризовать пептиды родственные инсулину из ганглиев двустворчатого моллюска *A. cygnea*. Мы показали, что, как и у других видов беспозвоночных, нервная ткань моллюска способна синтезировать РИП, которые обнаруживаются в клетках коркового слоя ганглиев. Неупорядоченное расположение этих клеток в отличие от более высокоорганизованных беспозвоночных позволяет говорить о присутствии у данного вида начального этапа развития системы синтезирующей инсулиноподобные пептиды.

С использованием хроматографических методов, из ганглиев *A. cygnea* было выделено 19 изоформ РИП. Полученные РИП проявили способность связываться с рецепторами инсулина и ИФР-I млекопитающих, что предполагает присутствие на данном этапе филогенеза инсулиноподобных молекул, обладающих ростовыми и метаболическими функциями. Однако более высокое родство РИП к рецепторам ИФР-I свидетельствует о преобладании у нейропептидов моллюска ростовой активности. Для дальнейшей характеристики выделенных пептидов было показано участие аденилатциклазной системы, в передаче гормонального сигнала РИП. Отдельные пептиды оказали дозозависимое стимулирование активности АЦ и ГТФ-связывания G-белков сходным с инсулином и ИФР-I образом, что свидетельствует о консервативности механизмов передачи сигнала кодируемого ИПП в разных филетических линиях.

Становится все более очевидным, что молекулярная эволюция относительно небольших инсулиноподобных молекул и систем, обеспечивающих их функционирование, происходили в крайне детерминированных условиях, ограничивающих вариации структуры этих пептидов. Филогенетические изменения гормонов инсулинового суперсемейства можно условно разделить на «макро-» и «микроэволюционные». Макроуровень отражает изменения структуры пептидов, связанные с приобретением новых функций и затрагивающие не только гормон, но и структуры обеспечивающие передачу гормонального сигнала, что в конечном

итоге приводит к появлению из общего пептида-предшественника инсулина, ИФР и релаксина. Микроуровень оперирует изменениями, как правило, не затрагивающими участки молекулы гормона, ответственные за связывающие места с рецептором, что позволяет пептиду сохранять принадлежность к определенному семейству.

Макро- и микрорезволюционные модификации инсулиноподобных гормональных молекул и обеспечивающих их функционирование систем, прослеживается на примере исследованных нами РИП моллюска *A. cygnea*. В первую очередь, на это указывает множественность пептидных изоформ, обладающих инсулиновой и ИФР-подобной активностью, что можно считать свидетельством в пользу существования на ранних этапах филогенеза белка-предшественника общего для гормонов инсулинового суперсемейства.

Выявленная способность множественных изоформ РИП моллюска взаимодействовать с рецепторами инсулина и ИФР-I говорит о принципиальной возможности осуществления сходных с гормонами позвоночных эффектов, что свидетельствует о консервативности конкретных функциональных свойств, сохраненных в процессе эволюции.

Дальнейшее изучение функций и установление структуры РИП моллюска могут оказаться существенными как для понимания регуляторной роли этих нейропептидов, так и эволюции гормонов инсулинового суперсемейства.

ВЫВОДЫ

1. В цереброплевральных, педальных и висцеропаретальных ганглиях пресноводного моллюска *Anodonta cygnea* выявлены нейроны, содержащие пептиды, способные взаимодействовать с антителами к инсулину позвоночных. Расположение инсулин-иммунореактивных клеток не имело упорядоченности, характерной для более высокоорганизованных беспозвоночных животных. Результаты ПЦР-анализа по выявлению мРНК, кодирующих родственные инсулину пептиды моллюска, показали различия в экспрессии пептидов в отдельных видах ганглиев.
2. Родственные инсулину пептиды выделены из ганглиев моллюска *A. cygnea* с применением оригинального метода ионообменной хроматографии используемого для получения инсулина. Очистка пептидов с помощью двуступенчатой высокоэффективной жидкостной хроматографии выявила 19 пептидных изоформ, различающихся по величине относительной гидрофобности (30-49 % концентрации ацетонитрила в сравнении с 39% инсулина), что косвенно отражает различия первичных структур отдельных изоформ.

3. Полученные РИП моллюска при тестировании в видоспецифичной радиолигандной системе инсулина проявили принципиальную способность взаимодействия с рецептором инсулина позвоночных, при этом отдельные пептидные изоформы значительно различались по степени сродства к рецептору инсулина (IC_{50} 17-1700 нМ).
4. РИП моллюска при тестировании в радиолигандной системе ИФР-I проявили способность конкурировать за связывание с рецептором ИФР-I. Показано, что большинство пептидов моллюска взаимодействовали с рецептором ИФР-I с более высоким сродством, чем с рецептором инсулина.
5. РИП дозозависимо стимулировали активность аденилатциклазы и ГТФ-связывания в мышечной и нервной тканях моллюска, оказывая эффекты сопоставимые с инсулином и ИФР-I. При этом выявлена ткане- и видоспецифичность действия РИП. Использование синтетических пептидов соответствующих С-концевым участкам альфа-субъединиц G-белков показало, что пептиды моллюска преимущественно действуют через G-белки стимулирующего типа сходным с инсулином и ИФР-I образом.
6. Выявленный функциональный полиморфизм и предполагаемое структурное разнообразие РИП моллюска свидетельствуют в пользу того, что эти пептиды являются одной из ключевых точек дивергенции гормонов инсулинового суперсемейства

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Русаков Ю.И., Колычев А.П., Шипилов В.Н., Бондарева В.М. Инсулиноподобные пептиды цереброплеврального ганглия моллюска *Anodonta cygnea*: выделение, очистка и радиолигандный анализ // Ж. эвол. биохим. физиол. 2003. Т. 39. № 4. С. 339-345.
2. Шпак А.О., Шипилов В.Н., Бондарева В.М., Кузнецова Л.А., Плесева С.А., Русаков Ю.И., Перцева М.Н. Регуляторное действие родственных инсулину нейропептидов моллюска *Anodonta cygnea* на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы // Нейрохимия. 2004. Т. 21. № 4. С.250-259.
3. Русаков Ю.И., Колычев А.П., Шипилов В.Н., Бондарева В.М. Очистка и лиганд-рецепторный анализ инсулиноподобных пептидов педального ганглия моллюска *Anodonta cygnea* // Цитология. 2004. Т. 46. № 5. С. 442-447.

4. **Шипилов В.Н.** Инсулиноподобные нейропептиды моллюска *Anodonta cygnea* L.: функциональные свойства и амплификация специфичных мРНК // Вест. мол. уч. 2004. Т. 2. С. 36-42.
5. **Shipilov V. N., Shpakov A. O., Rusakov Y. I.** Pleiotropic action of insulin-like peptides of mollusk, *Anodonta cygnea* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005. V. 1040. P. 464-465.
6. **Шпаков А.О., Шипилов В.Н., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А., Бондарева В.М., Плеснева С.А., Перцева М.Н.** Молекулярные механизмы регуляторного действия биогенных аминов на функциональную активность аденилатциклазной сигнальной системы в нервных ганглиях моллюска *Anodonta cygnea* // Докл акад. наук. 2005. Т. 401. №6. С. 829-832.
7. **Shipilov Valerii, Rusakov Yurii.** Purification and characterization of insulin-related peptides from different ganglia of bivalve mollusc *Anodonta cygnea* // Abstr. VII east European conference of the international society for invertebrate neurobiology, "Simple nervous systems Kaliningrad-Svetlogorsk-Otradnoe. 2003. P. 102.
8. **Spakov Alexander, Shipilov Valerii.** Regulation of adenylyl cyclase system of bivalve mollusk *Anodonta cygnea* ganglions by biogenic amines and peptide hormones. // Abstr. VII east European conference of the international society for invertebrate neurobiology, «Simple nervous systems». 2003. Kaliningrad-Svetlogorsk-Otradnoe. P. 103.
9. **Shipilov V.N., Spakov A.O., Rusakov Yu. I.** Pleotropic effects of insulin-related peptides isolated from mollusc *Anodonta cygnea* // Abst. for The 22nd Conference of European Comparative Endocrinologists. Upsala J. Med. Sci. Suppl. 2004. N. 56. P. 90. Uppsala, Sweden.
10. **Шипилов В.Н., Шпаков А.О., Русаков Ю.И.** Функциональные особенности инсулиноподобных пептидов пресноводного моллюска *Anodonta cygnea* // Международная научная конференция «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. 2004. Петрозаводск. С. 152.
11. **Шипилов В.Н., Бондарева В.М., Русаков Ю.И.** Иммуноцитохимическая идентификация родственных инсулину нейропептидов в ганглиях моллюска *Anodonta cygnea* // Тез. VII Всероссийской конференции «Нейроэндокринология – 2005». 2005. С.-Петербург. С. 190.

Лицензия ЛР №020593 от 07.08.97

Подписано в печать 21.10.2005. Формат 60x84/16. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,5. Тираж 60. Заказ 124б.

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного автором,
в Цифровом типографском центре Издательства Политехнического университета.
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.
Тел.: 550-40-14
Тел./факс: 247-57-76



№ 20 1 2 4

РНБ Русский фонд

2006-4

18097