

3. **Endierov Nikolai Ivanovich**, Graduate Student, Department of Biotechnology and Processing of Agricultural Products, Chuvash State Agricultural Academy, 428003, Chuvash Republic, Cheboksary, K. Marks str., 29; e-mail: endierov64@mail.ru, tel. 8-937-373-46-06;

4. **Checheneshkina Olesya Yurevna**, Graduate Student, Department of Biotechnology and Processing of Agricultural Products, Chuvash State Agricultural Academy, 428003, Chuvash Republic, Cheboksary, K. Marks str., 29; e-mail: checheneshkina1991@yandex.ru, tel. 8-905-347-52-68.

УДК 636.084

РОЛЬ Сbх7 В РЕГУЛЯЦИИ МИГРАЦИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ КОЖНЫХ РАН У МЫШЕЙ

А.Н. Мардарьев¹⁾, Н.В. Мардарьева²⁾, Г.А. Ларионов²⁾

¹⁾Брэдфордский университет

Ричмонд Роад, Брэдфорд, BD7 1DP, Великобритания

²⁾Чувашская государственная сельскохозяйственная академия
428003, Чебоксары, Российская Федерация.

Аннотация. В настоящее время одним из приоритетных направлений биомедицинских исследований является изучение нарушений эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов в развитии ряда патологических процессов, таких как нарушение заживления ран, канцерогенез и клеточное старение. В данной работе было выявлено, что экспрессия Сbх7, являющегося компонентом поликомбного репрессивного комплекса ПРК1, снижена на мРНК и белковом уровнях в эпидермисе сразу после ранения кожи. Ингибирование Сbх7 белка с использованием специфического ингибитора MS37452 в мышечных кератиноцитах усиливает их миграционную активность после создания раны-царапины в культуре клеток. Таким образом, снижение уровня экспрессии Сbх7 в эпидермисе на ранних сроках заживления ран кожи необходимо для приобретения кератиноцитами миграционной активности, являющейся важным компонентом в механизме заживления кожи после повреждения. Исследования проводились на мышцах линии C57BL/6. Они содержались в условиях 12-часового дневного цикла при температуре воздуха $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности 40-60 %. Мыши были анестезированы внутривенной инъекцией смеси кетамин/ксилазин в дозе 100мг/10мг на кг веса. Раны (5 мм в диаметре) были нанесены пункционной биопсийной иглой 8-недельным самкам мышей на кожу спины. Образцы кожи были собраны на 0, 1, 3 и 5 дни после ранения и заморожены в жидком азоте для последующего хранения в холодильнике при температуре - 80° С. Было установлено, что ингибирование Сbх7 в первичной культуре клеток стимулирует миграционную активность кератиноцитов. Данный результат позволяет предположить, что снижение Сbх7 сразу после ранения кожи необходимо для приобретения эпидермальными кератиноцитами способности к миграции в раневой дефект.

Ключевые слова: кожа, заживление ран, группа поликомбных белков, Сbх7, лечение раны.

Введение. Кожа представляет собой систему для изучения механизмов, контролирующих регенерацию тканей, а также служит важным источником СК (стволовых клеток) [3, 9]. Эпителий кожи способен к быстрой регенерации и самообновлению за счет наличия нескольких пулов СК, расположенных в базальном слое эпидермиса и в волосяном фолликуле [3, 9, 20]. В неповрежденной коже фолликулярные СК регенерируют только волосяной фолликул, тогда как в поврежденной коже они также мигрируют в эпидермис и образуют эпидермальные клетки-предшественники [10, 11].

ГПБ (группа поликомбных белков) функционирует как транскрипционные репрессоры, играющие важную роль в контроле активности СК и в поддержании клеточной идентичности при их дифференцировке в специализированных типах клеток [4, 16]. ГПБ взаимодействуют друг с другом, образуя хроматин-ассоциированные поликомбные репрессивные комплексы двух видов (ПРК1 и ПРК2), что приводит к уплотнению хроматина и репрессии генов [6, 19]. Белки ПРК2-комплекса способствуют метилированию лизина 27 на гистоне H3 (H3K27me3) [19]. Модификация гистона H3K27me3 распознается белковым комплексом ПРК1, состоящим из нескольких белков, таких как Сbх7 и E3-лигазы Ring1/2. Ring1/2-белки модифицируют гистон H2A по лизиновому основанию в позиции 119 (H2AK119ub1), что приводит к уплотнению хроматина и ингибированию активности генов [6, 19].

Последние данные показывают, что ГПБ играют важную роль в процессе контроля при развитии кожи и регуляции активности эпителиальных СК кожи. Ряд ГПБ белков, таких как Bmi1, Ezh1/2 и Jarid2, стимулируют пролиферацию эпителиальных СК через репрессию ингибиторов клеточного цикла, а также тормозят преждевременную активацию генов дифференцировки [7, 8, 17]. Ezh1/2 также участвует в репрессии неэпидермальных генов в эпителиальных СК кожи [2, 7, 8]. Показано, что Сbх4, компонент ПРК1-комплекса, защищает от старения культивируемые эпидермальные клетки – предшественники человека, а также контролирует их пролиферацию и дифференциацию [12]. Кроме того, недавно было выявлено, что Сbх4 необходимо для эпидермального развития у мышей, поскольку поддерживает пролиферацию эпидермальных клеток-предшественников и предотвращает их преждевременную дифференцировку [1, 15]. Эти данные свидетельствуют о том, что Сbх4 является критическим детерминантом, регулирующим активность СК в гомеостазе и регенерации кожи.

Способность кожи к восстановлению после повреждения требует немедленных изменений в экспрессии генов, контролирующей клеточную пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Было выявлено, что экспрессия компонентов ПРК2-комплекса Ezh2, Eed и Suz12 уменьшается, в то время как уровни H3K27-деметирующих ферментов Jmjd3 и Utx увеличиваются в коже мыши в ходе нанесения раны [18]. Эти изменения приводят к снижению уровня гистона H3K27me3 и уменьшению связывания Eed с промотором Muc и Egfr генов и их последующей активации, что необходимо для заживления кожи [18]. Данное наблюдение позволяет заключить, что снижение активности ПРК2-комплекса необходимо для индукции генов, участвующих в регенерации кожи после повреждения [18]. В тоже время многие гены, связанные с дифференцировкой и клеточным старением, остаются репрессированными в базальных эпидермальных клетках, расположенных вблизи ран. Это позволяет заключить, что существуют другие репрессивные механизмы, подавляющие активность генов, не участвующих в регенерации кожи. Предположительно ПРК1-комплекс является еще одним важным регулятором, контролирующим экспрессию генов в ходе заживления ран. Однако остается неизвестным, какие ключевые моменты (пролиферация или миграция) контролируются Сбх белками, входящими в ПРК1-комплекс, в ходе заживления ран кожи.

Целью данного исследования является изучение экспрессии белка Сбх7 в коже мышей до и после ранения, а также выявление его роли в регуляции клеточной миграции.

Материалы и методы. Исследования проводились на мышах линии C57BL/6 по протоколам, утвержденным Университетом Брэдфорда и Чувашской государственной сельскохозяйственной академией. Мыши содержались в условиях 12-часового дневного цикла при температуре воздуха $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности 40-60%. C57BL/6 мыши были приобретены у компании Charles River (Великобритания).

Мыши были анестезированы внутривенной инъекцией смеси кетамин/ксилазин в дозе 100 мг/10 мг на кг веса. Раны (5 мм в диаметре) были нанесены пункционной биопсийной иглой 8-недельным самкам мышей на кожу спины. Образцы кожи были собраны на 0, 1, 3 и 5 дни после ранения и заморожены в жидком азоте для последующего хранения в холодильнике при температуре -80°C .

Выделение и культивирование первичных мышечных кератиноцитов. Эпидермис новорожденных мышей был отделен от дермиса путем инкубирования кожи в растворе 0,25 % трипсина при 4°C в течение 12-15 часов. Отделенный эпидермис добавлен в культуральную среду EMEM с содержанием 0,05 мм хлорида кальция, 4 % фетальной бычьей сыворотки, 0, 4 мкг/мл гидрокортизона, 5 мкг/мл инсулина, 10 мг/мл эпидермального фактора роста, 10^{-10} М холерного токсина, 2×10^{-9} трийодтиронина, 2 мм L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Для получения одноклеточной суспензии эпидермис был измельчен ножницами с последующим фильтрованием через кремниевый стрейнер (размер пор – 70 мкм). Клетки были посажены на пластиковые чашки, покрытые коллагеном, и культивировались в инкубаторе при 33°C и 5 % CO_2 .

Анализ миграции клеток путем метода «царапин». При достижении 90 % конfluenceности была сделана царапина в середине монослоя первичных кератиноцитов с использованием наконечника Р10 микропипетки. Для исследования роли Сбх7 в миграции клеток в две группы (по 3 чашки в каждой) был добавлен ингибитор Сбх7 (MS37452) в концентрации 50 мкМ и 100 мкМ соответственно. В две другие группы был добавлен ДМСО (диметилсульфоксид), и они использовались в качестве контрольной группы. Расстояния между краями царапины измерялись с помощью программного обеспечения ImageJ на 0, 6, 12 и 24 часа. С каждой чашки брались три измерения. Полученные данные усреднялись. Статистический анализ проводился с использованием Student's t-test.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. С помощью использования Тризол реагента (Invitrogen) клеточная РНК была изолирована из замороженных образцов ран кожи [14] с последующей конвертацией в комплементарную ДНК с помощью обратной транскрипционной системы (Promega). Последовательности праймеров для ПЦР (полимеразной цепной реакции) были получены из базы данных праймеров PrimerBank [22]. Синтез праймеров был осуществлен компанией Sigma-Aldrich (Великобритания). ПЦР проводили на инструменте StepOne Plus (Applied Biosystems, Великобритания) с использованием реагента 2xSYBR Master Mix (Applied Biosystems, Великобритания). Анализ данных был произведен с помощью программы Genex (Bio-Rad). Данные с трех репликатов были объединены и статистически проанализированы с использованием Student's t-test.

Иммунофлуоресцентный анализ. Для выявления экспрессии белков в каждой ране замороженные образцы кожи были порезаны на криостате толщиной 8-10 мкм из средней части ран. Срезы были зафиксированы в 4 % параформальдегиде в течение 10 минут при комнатной температуре с последующим промыванием в PBS буфере 3 раза по 5 минут. Срезы инкубировали с первичными антителами против Сбх7 (Abcam, 1:100 разведение) в течение 12-15 часов при температуре 4°C с последующим применением соответствующих вторичных антител, меченных флуоресцентной меткой Alexa-Cy-555 (Life Technologies; 1:200) в течение 60 минут при температуре 37°C . Срезы были заключены в DAPI (флуоресцентную среду с 6-диамидин-2-фенилиндоном) (Abcam, Великобритания)

Микрофотографии были сделаны с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 501 и цифровой камеры QImaging. Изображения анализировались с помощью программы Image Pro Express (Media Cybernetics, USA).

Результаты исследований и их обсуждение. Динамика Сбх7 экспрессии в эпидермисе после ранения кожи. Иммунофлуоресцентный анализ кожи до и после ранения выявил динамичную экспрессию белка Сбх7 в эпителиальных структурах кожи. В неповрежденной коже (день 0) Сбх7 экспрессируется кератиноцитами

эпидермиса и волосяного фолликула (рисунок 1А, стрелки). Однако на следующий день после ранения (день 1) было выявлено значительное снижение уровня Сбх7 в формирующемся раневом эпителии и прилегающем эпидермисе (рисунок 1Б, «наконечник»). По мере заживления раны на 3 и 5 день было выявлено увеличение экспрессии белка Сбх7 в прилегающем эпидермисе и сформированном раневом эпителии (рисунок 1В-Д, «наконечник»).

Похожая динамика в изменении уровня экспрессии Сбх7 мРНК была обнаружена путем ПЦР. Уровень Сбх7 мРНК-транскрипта резко уменьшился сразу после ранения с последующим увеличением его синтеза к 5-му дню (рисунок 1Д). Однако уровень Сбх7-транскрипта все еще оставался ниже, чем в неповрежденной коже (рисунок 1Д). Снижение уровня Сбх7 сразу после ранения кожи позволяет предположить, что активность ПРК1-комплекса также снижается, способствуя активации генов, участвующих в заживлении раны. Чтобы подтвердить это утверждение, необходимо определить уровень гистона H2AK119ub1, который катализируется ПРК1-комплексом, в дальнейших работах.

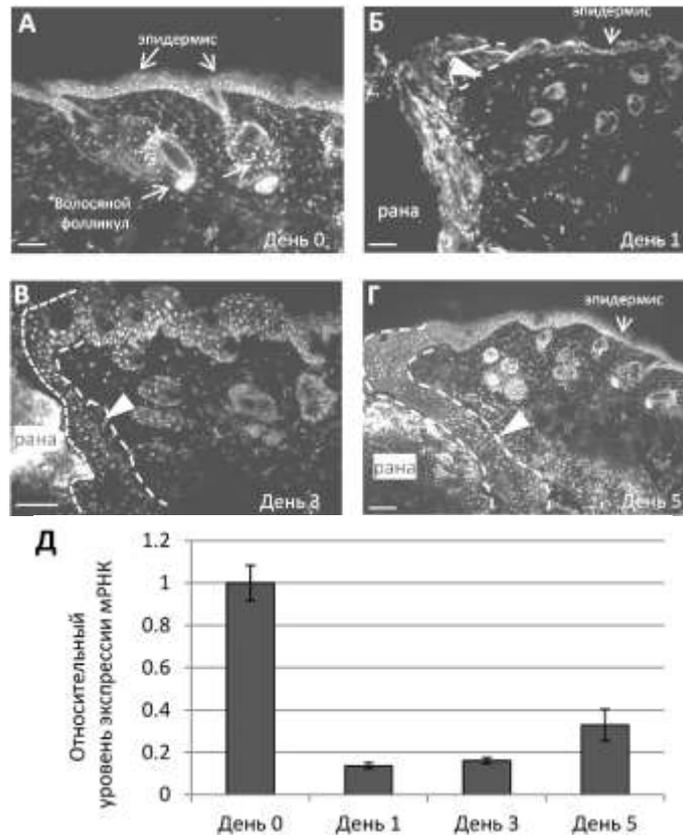


Рис. 1. Экспрессия Сбх7 белка и иРНК до и в разные сроки после ранения кожи.

А-Г – иммунофлюоресцентный анализ экспрессии Сбх7 белка в эпидермисе кожи на разных сроках заживления раны: день 0 (А), день (Б), день 3 (В) и день 5 (Г). Шкала – 100 мкм. Пунктирная линия и «наконечник» указывают на предметы раневого эпителия; Д – выявление уровня экспрессии мРНК Сбх7 с помощью ПЦР реального времени

Следует также выяснить, на каком сроке восстанавливается уровень Сбх7 после ранения кожи. Анализ кожи в сроки, когда раневой эпителий покрывает всю поверхность раны (7 день), и эпидермис полностью сформирован (14 день), позволил бы ответить на этот вопрос.

Ингибирование Сбх7 повышает миграцию эпидермальных кератиноцитов in vitro. В ответ на повреждение кожи эпидермальные кератиноциты начинают продуцировать регуляторные факторы, такие как Zeb1/2, Snail1/2, Twist1, которые способствуют частичной эпителиально-мезенхимальной транзисии и приобретению повышенной миграционной активности эпителиальными клетками в раневом эпителии [21]. Миграция кератиноцитов в рану является ключевым звеном в процессе заживления раны и восстановления целостности кожного покрова.

Чтобы проверить, влияет ли ингибирование Сбх7 на миграцию кератиноцитов, мы изолировали первичные кератиноциты из эпидермиса C57BL/6 мышей. Монослой культивированных клеток, достигших 90 % кофлюентности, был поцарапан для создания раневого пространства, куда мигрируют клетки (рисунок 2А). В исследование были включены 4 группы, две из которых находились под воздействием двух концентраций Сбх7 ингибитора MS37452, а в остальные две группы был добавлен ДМСО в качестве контроля (рисунок 2А). Измерение ширины раневого пространства в разные сроки после нанесения царапины позволил выявить ускорение миграции в группе с добавлением в культуральную среду MS37452 по сравнению с контрольными

группами. Обе концентрации MS37452 (50 мкМ и 100 мкМ) одинаково эффективно воздействовали на клеточную миграцию (рисунок 2Б, В).

Выводы.

Таким образом, ингибирование Сбх7 в первичной культуре клеток стимулирует миграционную активность кератиноцитов. Данный результат позволяет предположить, что снижение Сбх7 сразу после ранения кожи необходимо для приобретения эпидермальными кератиноцитами способности к миграции в раневой дефект. Важными вопросами, которые остаются открытыми, являются следующие: какие гены регулируются Сбх7 белком и что контролирует уровень Сбх7 и его снижение в эпидермальных клетках сразу после ранения кожи. Ответы на эти вопросы позволят не только лучше понять функциональную значимость Сбх7 и ПРК1-комплекса в гомеостазе кожи, но и способствовать созданию новых терапевтических методов ускорения заживления ран, в том числе при лечении хронических язв кожи.

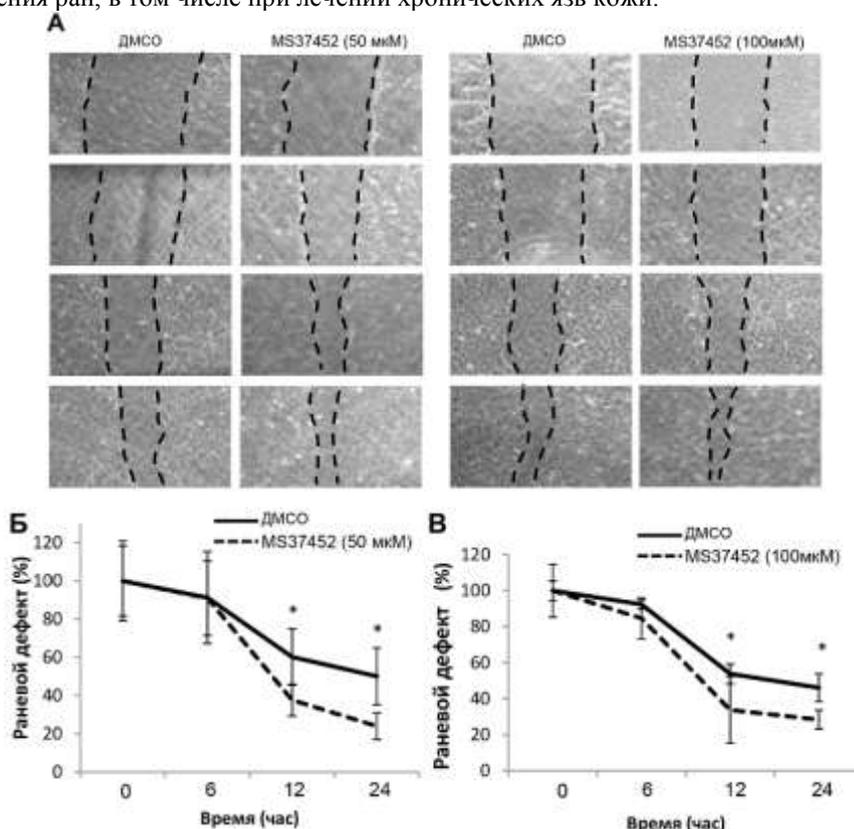


Рис. 2. Миграция первичных кератиноцитов после ингибирования Сбх7 белка.

А – Миграция эпидермальных кератиноцитов в первые 24 часа после нанесения царапин под влиянием Сбх7 ингибитора MS37452 и ДМСО. Б, В – процент ширины раны-царапины по отношению к изначальной ширине дефекта (100%) на срок 6, 12, 24 часа после воздействий MS37452 и ДМСО. * указывает на достоверные различия ($p < 0.05$)

Литература

1. Мардарьев, А. Н. Роль Сбх4 в заживлении кожных ран у мышей / А. Н. Мардарьев, Н. В. Мардарьева // Научно-образовательная среда как основа развития агропромышленного комплекса и социальной инфраструктуры села материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ФГБОУ ВО Чувашская ГСХА. – Чебоксары, 2016. – С. 305-310.
2. Bardot E., Valdes V. J., Zhang J., Perdigo C. N., Nicolis S., Hearn S. A., Silva J. M., Ezhkova E. Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *EMBO J.* 2013(32):1990-2000.
3. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009(10):207-217.
4. Boyer L., Plath, K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L. A., Lee T. I., Levine S. S., Wernig M., Tajonar A., Ray M. K., Bell G. W., Otte A. P., Vidal M., Gifford D. K., Young R. A., Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006(441):349-353.
5. Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell.* 2001.7:1267-1278.
6. Di Croce L., Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013(20):1147-1155.

7. Ezhkova E., Lien W. H., Stokes N., Pasolli H. A., Silva J. M., Fuchs E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes Dev.* 2011(25):485-498.
8. Ezhkova E., Pasolli H. A., Parker J. S., Stokes N., Su I. H., Hannon G., Tarakhovsky A. Fuchs, E. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell.* 2009(136):1122-1135.
9. Fuchs E. *J. Cell Biol.* Skin stem cells: rising to the surface. 2008 (180):273-284.
10. Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R. J., Cotsarelis G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005(11): 1351-1354.
11. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B. D., Morgan B. A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 2007(21):1358-1366.
12. Liu B., Liu Y. F., Du Y. R., Mardaryev A. N., Yang W., Chen H., Xu Z. M., Xu C. Q., Zhang X. R., Botchkarev V. A., Zhang Y., Xu G. L. Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function. *Development.* 2013. 140(4):780-800.
13. Luis N., Morey L., Mejetta S., Pascual G., Janich P., Kuebler B., Cozutto L., Roma G., Nascimento E., Frye M., Di Croce L., Benitah S. A. Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb- dependent and -independent functions of Cbx4. *Cell Stem Cell.* 2011(9):233-246.
14. Mardaryev A. N., Gdula M. R., Yarker J. L., Emelianov V. U., Poterlowicz K., Sharov A. A., Sharova T. Y., Scarpa J. A., Joffe B., Solovei I., Chambon P., Botchkarev V. A., Fessing M. Y. p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal differentiation complex locus in epidermal progenitor cells. *Development.* 2014. 141:101-111.
15. Mardaryev A. N., Liu B., Rapisarda V., Poterlowicz K., Malashchuk I., Rudolf J., Sharov A. A., Jahoda C. A., Fessing M. Y., Benitah S. A., Xu G. L., Botchkarev V. A. Cbx4 maintains the epithelial lineage identity and cell proliferation in the developing stratified epithelium. *J Cell Biol.* 2016. 212(1):77-89.
16. Margueron R., Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011(469):343-349 (2011).
17. Mejetta S., Morey L., Pascual G., Kuebler B., Mysliwiec M. R., Lee Y., Shiekhattar R., Di Croce L., Benitah S. A. Jarid2 regulates mouse epidermal stem cell activation and differentiation. *EMBO J.* 2011(30):3635-3646.
18. Shaw T., Martin P. Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO reports.* 2009. 10:881-886.
19. Simon J., Kingston R. E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009(10):697-708.
20. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W. E., Rendl M., Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2003(303): 359-363.
21. Yan C., Grimm W. A., Garner W. L., Qin L., Travis T., Tan N., Han Y. P. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2. *The Am J of Pathol.* 2010. 176: 2247-2258.
22. Режим доступа: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>.

Сведения об авторах

1. **Мардарьев Андрей Николаевич**, доктор биологии и медицины, Брэдфордский Университет, Брэдфорд, BD7 1DP, Великобритания, e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk, тел.+44-1274237432;
2. **Мардарьева Наталия Валерьевна**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции, Чувашская государственная сельскохозяйственная академия, 428003, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, 29;
3. **Ларионов Геннадий Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологий и переработки сельскохозяйственной продукции, Чувашская государственная сельскохозяйственная академия, 428003, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, 29, e-mail: laronovga@mail.ru, тел. 8-909-301-34-86.

THE ROLE OF CBX7 IN REGULATION OF KERATINOCYTE MIGRATION DURING WOUND HEALING IN MICE

A.N. Mardaryev, N.V. Mardaryeva, G.A. Larionov

*University of Bradford
Bradford, BD7 1DP, United Kingdom
Chuvash State Agricultural Academy
428003, Cheboksary, Russian Federation*

Abstract. *The understanding of alterations of epigenetic mechanisms in the development of many disorders, such as impaired wound healing, cancer, and ageing, is increasingly seen as a priority in biomedical research. Here, we show that expression of Cbx7, a subunit of Polycomb Repressive Complex 1, is decreased on both mRNA and protein levels in mouse epidermis immediately after skin wounding. Furthermore, Cbx7 inhibition using a specific small molecule inhibitor MS37452 stimulates migration of primary mouse epidermal keratinocytes in in vitro scratch assay.*

These data suggest that Cbx7 down-regulation is required for acquisition of the migratory activity by epidermal cells at early stages of wound healing in mice. The studies were performed on C57BL/6 mice. The mice were kept in a 12-hour day cycle, at an air temperature of 21±1°C and a moisture content of 40-60%. C57BL/6. The mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine mixture at a dose of 100 mg/10 mg per kg of body weight. Wounds (5 mm in diameter) were applied using a needle biopsy needle to the back skin of 8-week-old female mice. Skin samples were collected at 0, 1, 3 and 5 days after injury and frozen in liquid nitrogen for subsequent storage in a refrigerator at -80°C. It was found that inhibition of Sbx7 in the primary cell culture stimulates the migration activity of keratinocytes. This result suggests that a decrease in Sbx7 immediately after skin injury is necessary for the acquisition of epidermal keratinocytes to migrate to a wound defect.

Key words: skin, stem cells, polycomb group proteins, Cbx7, wound healing.

References

1. Mardaryev A.N., The role of cbx4 in regulation of wound healing in mice/ A.N. Mardaryev, N.V. Mardaryeva / In the collection: Scientific-educational environment as a basis for the development of agro-industrial complex, social infrastructure of the village proceedings of the international scientific and practical conference (dedicated to the 85th anniversary of the Chuvash State Agricultural Academy). Chuvash State Agricultural Academy. - 2016. - Pp.305-310.
2. Bardot E., Valdes V. J., Zhang J., Perdigoto C. N., Nicolis S., Hearn S. A., Silva J. M., Ezhkova E. Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *EMBO J.* 2013(32):1990-2000.
3. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009(10): Pp. 207-217.
4. Boyer L., Plath, K., Zeitlinger J., Brambrink T., Medeiros L. A., Lee T. I., Levine S. S., Wernig M., Tajonar A., Ray M. K., Bell G. W., Otte A. P., Vidal M., Gifford D. K., Young R. A., Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006(441): Pp. 349-353.
5. Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschuere K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell.* 2001.7: Pp. 1267-1278.
6. Di Croce L., Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013(20): Pp. 1147-1155.
7. Ezhkova E., Lien W. H., Stokes N., Pasolli H. A., Silva J. M., Fuchs E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes Dev.* 2011(25): Pp. 485-498.
8. Ezhkova E., Pasolli H. A., Parker J. S., Stokes N., Su I. H., Hannon G., Tarakhovsky A. Fuchs, E. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell.* 2009(136): Pp. 1122-1135.
9. Fuchs E. *J. Cell Biol.* Skin stem cells: rising to the surface. 2008 (180): Pp. 273-284.
10. Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R. J., Cotsarelis G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005(11): Pp. 1351-1354.
11. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B. D., Morgan B. A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 2007(21): Pp. 1358-1366.
12. Liu B., Liu Y. F., Du Y. R., Mardaryev A. N., Yang W., Chen H., Xu Z. M., Xu C. Q., Zhang X. R., Botchkarev V. A., Zhang Y., Xu G. L. Cbx4 regulates the proliferation of thymic epithelial cells and thymus function. *Development.* 2013. 140(4): Pp. 780-800.
13. Luis N., Morey L., Mejetta S., Pascual G., Janich P., Kuebler B., Cozutto L., Roma G., Nascimento E., Frye M., Di Croce L., Benitah S. A. Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb-dependent and -independent functions of Cbx4. *Cell Stem Cell.* 2011(9): Pp. 233-246.
14. Mardaryev A. N., Gdula M. R., Yarker J. L., Emelianov V. U., Poterlowicz K., Sharov A. A., Sharova T. Y., Scarpa J. A., Joffe B., Solovei I., Chambon P., Botchkarev V. A., Fessing M. Y. p63 and Brg1 control developmentally regulated higher-order chromatin remodelling at the epidermal differentiation complex locus in epidermal progenitor cells. *Development.* 2014. 141: Pp. 101-111.
15. Mardaryev A. N., Liu B., Rapisarda V., Poterlowicz K., Malashchuk I., Rudolf J., Sharov A. A., Jahoda C. A., Fessing M. Y., Benitah S. A., Xu G. L., Botchkarev V. A. Cbx4 maintains the epithelial lineage identity and cell proliferation in the developing stratified epithelium. *J Cell Biol.* 2016. 212(1): Pp. 77-89.
16. Margueron R., Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011(469): Pp. 343-349 (2011).
17. Mejetta S., Morey L., Pascual G., Kuebler B., Mysliwiec M. R., Lee Y., Shiekhhattar R., Di Croce L., Benitah S. A. Jarid2 regulates mouse epidermal stem cell activation and differentiation. *EMBO J.* 2011(30): Pp. 3635-3646.
18. Shaw T., Martin P. Epigenetic reprogramming during wound healing: loss of polycomb-mediated silencing may enable upregulation of repair genes. *EMBO reports.* 2009. 10: Pp. 881-886.
19. Simon J., Kingston R. E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009(10): Pp. 697-708.

20. Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W. E., Rendl M., Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2003(303): Pp. 359-363.
21. Yan C., Grimm W. A., Garner W. L., Qin L., Travis T., Tan N., Han Y. P. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2. *The Am J of Pathol*. 2010. 176: Pp. 2247-2258.
22. Access mode: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>.

Information about authors

1. **Mardaryev Andrei Nikolaevich**, PhD in Medical Biosciences, University of Bradford, Bradford, BD7 1 DP, UK, e-mail: a.mardaryev@bradford.ac.uk, tel. +44-1274234732.
2. **Mardaryeva Natalia Valerevna**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Department of Biotechnology and Processing of Agricultural Products, Chuvash State Agricultural Academy, 428003, Chuvash Republic, Cheboksary, 29, K. Marks str.; e-mail: volga480@yandex.ru, tel. 8-927-841-12-21.
3. **Larionov Gennadiy Anatolyevich**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of Department of Biotechnology and Processing of Agricultural Products, Chuvash State Agricultural Academy, 428003, Chuvash Republic, Cheboksary, 29, K. Marks str.; e-mail: larionovga@mail.ru, tel. 8-909-301-34-86.

УДК 636.2.034:636.033

МЯСНЫЕ КАЧЕСТВА БЫЧКОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ НА ФОНЕ ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ ОРГАНИЗМА

В.Г. Семенов, Ф.П. Петрянкин, Р.М. Мударисов, Д.А. Никитин, В.А. Васильев, А.В. Лопатников
*Чувашская государственная сельскохозяйственная академия,
428003, Чебоксары, Российская Федерация*

Аннотация. Впервые на основе комплексных исследований научно обоснована и экспериментально доказана зоотехническая целесообразность применения разработанных биопрепаратов *Prevention-N-A* и *Prevention-N-E* в технологии производства говядины для реализации биоресурсного потенциала мясных качеств бычков черно-пестрой породы. На фоне применения биопрепаратов установлена активизация роста и развития бычков в периоды выращивания, доращивания и откорма, что обусловило более высокие убойные и мясные качества туш и, как следствие, выход ценных отрубов: спиногрудного – на 6,1 и 4,0 кг ($P < 0,01-0,001$), поясничного – на 2,6 и 1,7 кг ($P < 0,05-0,01$) и тазобедренного – на 8,6 и 7,1 кг ($P < 0,001$), нежели в контроле. Наибольшим содержанием мякоти высшего сорта характеризовались туши бычков 1-й ($27,8 \pm 0,72$ кг) и 2-й ($26,7 \pm 0,58$ кг) опытных групп соответственно: на 3,5 и 2,4 кг по сравнению с контролем ($24,3 \pm 0,73$ кг), а также их отруба: спиногрудной – на 0,9 и 0,7 кг, поясничный – на 0,5 и 0,3 кг, тазобедренный – на 2,3 и 1,5 кг ($P < 0,05-0,001$). Доказана доброкачественность мясных туш по органолептическим, биохимическим и спектрометрическим показателям и, следовательно, безопасность испытуемых препаратов. Установлено, что реализация биоресурсного потенциала организма бычков была вызвана активизацией гемопоэза, клеточных и гуморальных факторов неспецифической устойчивости на фоне применения биопрепаратов при более выраженном соответствующем эффекте *Prevention-N-A*. Новизна полученных данных подтверждена патентами РФ на изобретение № 2602687 и № 2622765, зарегистрированных в Государственном реестре изобретений РФ от 26.10.2016 г. и 19.06.2017 г. соответственно.

Ключевые слова: бычки; выращивание; доращивание; откорм; биопрепараты *Prevention-N-A* и *Prevention-N-E*; мясные качества.

Введение. Несмотря на значительные успехи современной зоотехнической науки, проблема обеспечения населения страны высококачественной продукцией животноводства, в том числе говядиной, является одной из актуальных.

По объемам производства отечественная скотоводческая отрасль отстает от целевых показателей на 25 %, при этом более 95 % говядины производится за счет убоя на мясо сверхремонтного молодняка и выбракованного взрослого поголовья скота молочного и комбинированного направлений продуктивности, убойный контингент которых и уровень продуктивности не обеспечивают необходимые объемы производства [1, 5, 9]. В большинстве регионов России, в том числе и в Чувашии, преобладающей по численности поголовья из пород молочного скота остается черно-пестрая (55,7 %), как наиболее высокопродуктивная, с хорошей оплатой корма продукцией. В результате селекции скот приобрел черты, присущие молочному типу, но с хорошими признаками мясности, и обладает большим потенциалом продуктивности, превосходящим многие породы по зоотехническим и экономическим показателям. Поэтому для производства говядины в основном используется молодняк черно-пестрой породы, более адаптированный к условиям кормления и содержания и максимально реализующий биоресурсный потенциал [3, 4, 8].

С целью предупреждения иммунодефицитного состояния, стимулирования уровня неспецифической защиты организма к прессингу эколого-технологических стресс-факторов и реализации биоресурсного потенциала мясных качеств бычков используют широкий ассортимент кормовых и биоактивных добавок,