

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 75 • № 1 • 2020 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора

Кирпичников М.П., Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Наш журнал — 2020:
что и как мы публикуем 3

Оригинальные исследования

Гвоздев Д.А., Максимов Е.Г., Пашенко В.З. Фотовыцветание молекул
фталоцианинов в составе комплекса с коллоидными квантовыми точками. 9

Негашева М.А., Зимина С.Н., Хафизова А.А., Сиразетдинов Р.Э.,
Синева И.М. Эпохальные изменения морфотипа современного человека
(по антропометрическим данным ретроспективного исследования
московской молодёжи). 15

Котлярова М.С., Солдатенко А.С., Архипова А.Ю., Бессонов И.В.,
Давыдова Л.И., Мойсенович А.М., Богуш В.Г., Дебабов В.Г.,
Штиль А.А., Мойсенович М.М., Шайтан К.В. Фотоотверждаемые
пленки на основе фиброина и желатина для регенерации кожных покровов 23

Кузьмин В.С., Иванова А.Д., Пустовит К.Б., Абрамочкин Д.В.
Изменения электрофизиологических характеристик рабочего
предсердного миокарда крысы при его липотрансфекции микроРНК
miR-1-3p, miR-153-3p и miR-133a-3p 31

Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В.,
Осмоловский А.А. Секреция микромицетами протеиназ с активностью,
подобной активности белков системы гемостаза 37

Боне К.Д., Бочаркина Ю.В., Карлов Г.И., Разумова О.В. Использование
межмикросателлитных маркеров для анализа полиморфизма облепихи
крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) различного происхождения 43

CONTENTS

Editorial

- Kirpichnikov M.P., Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Editorial our journal – 2020: what and how we publish 3

Research articles

- Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Paschenko V.Z. Photobleaching of phthalocyanines in the complex with colloidal quantum dots 9
- Negasheva M.A., Zimina S.N., Khafizova A.A., Sirazetdinov R.E., Sineva I.M. Secular changes in morphotype of modern human (based on anthropometric data from retrospective survey of Moscow youth) 15
- Kotlyarova M.S., Soldatenko A.S., Arkhipova A.Yu., Bessonov I.V., Davydova L.I., Moisenovich A.M., Bogush V.G., Debabov V.G., Shtil A.A., Moisenovich M.M., Shaitan K.V. Photocurable films based on fibroin and gelatin for regeneration of skin cover. 23
- Kuzmin V.S., Ivanova A.D., Pustovit K.B., Abramochkin D.V. Lipotransfection of miR-1-3p, miR-133A-3p AND miR-153-3p changes the electrophysiological characteristics of rat working myocardium. 31
- Lukianova A.A., Kornienko E.I., Vigand P.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. Secretion of proteinase with activity that is similar to activity of proteins of the hemostatic system by micromycetes 37
- Bone K.D., Bocharkina I.V., Karlov G.I., Razumova O.V. The use of ISSR markers for the analysis of polymorphism in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) of different origin. 43

ОТ РЕДАКТОРОВ

УДК 002:[57.01-08+573]

НАШ ЖУРНАЛ – 2020: ЧТО И КАК МЫ ПУБЛИКУЕМ

М.П. Кирпичников¹, Г.В. Моргунова², А.Н. Хохлов^{2,*}

¹Кафедра биоинженерии и ²сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Краткий обзор, посвященный последним изменениям в редакционной политике и содержании журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» с особым акцентом на ситуацию с его англоязычной версией – «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Описываются текущая стратегия рассмотрения редколлегией поступающих рукописей, их отклонения, рецензирования и редактирования, а также распределения работ по новым рубрикам издания. Рассматриваются требования к языку статей, составлению списков литературы и статистическому анализу полученных авторами данных. Приводятся как информация о росте наукометрических показателей журнала за последние годы, так и список баз данных, в которых издание индексируется в настоящее время. Отмечаются различия в интересе к опубликованным статьям между зарубежными и отечественными читателями. Приводятся данные о количестве скачиваний наиболее популярных статей с интернет-сайта издательства Springer Nature. Анализируются тематики статей, опубликованных в журнале в 2017–2019 гг. Подчеркивается приоритетность для редколлегии обзоров, затрагивающих как фундаментальные, так и прикладные аспекты исследований в области биологии, биомедицины и биотехнологии.

Ключевые слова: научные публикации, редакционная политика, рецензирование, списки литературы, наукометрические показатели, скачивание статей, «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология», «Moscow University Biological Sciences Bulletin», обзор

За последние несколько лет наш журнал претерпел значительные изменения. Они затронули обе его версии – как русскоязычную («Вестник Московского университета. Серия 16. Биология»), так и англоязычную («Moscow University Biological Sciences Bulletin»). В настоящем коротком редакционном обзоре¹ мы бы хотели остановиться на анализе таких изменений и рассмотреть их предварительные результаты. Подробнее посмотреть на наши издания и оценить их наукометрические показатели можно, используя соответствующие интернет-сайты:

для англоязычной версии:

<https://www.springer.com/journal/11966>

<https://link.springer.com/journal/11966>

<https://www.scopus.com/sourceid/21100204913>

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100204913&tip=sid&clean=0>

<https://www.pleides.online/en/journal/bbscimgu>

для русскоязычной версии:

<https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour>

https://elibrary.ru/title_about.asp?id=8371

<https://www.bio.msu.ru/doc/index.php?ID=324>

<https://msupress.com/catalogue/magazines/biologiya/1456>

Итак, в первую очередь нужно отметить, что мы изменили рубрику журнала. Раньше в качестве рубрик мы использовали названия различных областей биологии («Зоология», «Ботаника», «Молекулярная биология», «Биохимия» и т.д.). Однако в настоящее время подавляющее большинство работ выполняется на стыке целого ряда специальностей, так что конкретная статья может быть легко помещена одновременно в 5–6 рубрик подобного рода. Скажем, многие зоологические или ботанические исследования выполняются с использованием методов биоинформатики, биохимии, биофизики, молекулярной биологии и т.п. В результате мы приняли решение отменить предыдущий рубрикатор и ввести следующие новые рубрики: «От редактора», «Обзоры», «Оригинальные исследования», «Краткие сообщения». Теперь рубрикация поступающих в редакцию статей стала гораздо менее проблемной и больше не вызывает недоуменных вопросов у авторов и читателей нашего журнала.

Ориентируясь на современные требования к этическим аспектам публикации научных статей, мы сделали обязательными указания в каждой работе на наличие/отсутствие исследований на людях и животных, а также на соответствие протоколов таких исследований требованиям со-

¹ М.П. Кирпичников – главный редактор журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология / Moscow University Biological Sciences Bulletin», Г.В. Моргунова – ответственный секретарь редколлегии, А.Н. Хохлов – заместитель главного редактора.

ответствующих комитетов и комиссий по биологической этике. Кроме того, авторы в обязательном порядке должны отмечать в тексте отсутствие у них конфликтов интересов, а также указывать источники финансирования проведенной работы.

К сожалению, часто к нам поступают рукописи, написанные на достаточно плохом русском языке. Это сильно осложняет работу не только рецензентов и редакторов, но и переводчиков, работающих над англоязычными версиями статей. В результате это отражается на качестве публикаций в журнале «Moscow University Biological Sciences Bulletin», представляющем особый интерес как для нас, так и для наших читателей в силу того, что его статьи, во-первых, доступны широкой международной аудитории, а во-вторых, индексируются в целом ряде наукометрических баз данных (данные с сайта издательства Springer Nature): AGRICOLA, EBSCO Discovery Service, EMBiology, Gale, Gale Academic OneFile, Gale InfoTrac, Google Scholar, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Meta, Naver, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Biological Science Database, ProQuest Central, ProQuest Natural Science Collection, ProQuest SciTech Premium Collection, ProQuest-ExLibris Primo, ProQuest-ExLibris Summon, SCImago, SCOPUS.

Индексирование журнала в этих базах данных привлекло к нам большое количество ученых-биологов, заинтересованных в получении грантов от научных фондов, учитывающих наукометрические показатели публикаций.

В этой связи надо заметить, что несколько лет назад наш журнал был предназначен главным образом для сотрудников биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Однако мы решили, ориентируясь на требования международных систем глобального цитирования, расширить географическое разнообразие принимаемых к публикации статей, так что в настоящее время наше издание открыто для исследователей из любых научных организаций самых разных стран. Единственное условие — направление в редакцию рукописи на русском языке. При этом представление авторами дополнительно перевода своей статьи на английский язык только приветствуется, т.к. это сильно облегчает работу переводчикам и редакторам англоязычной версии издания. В 2017–2019 гг. мы опубликовали целый ряд статей, среди авторов которых были наши коллеги из Италии [1, 2], США [3–6], КНР [2, 7], Польши [8], ЮАР [9], Вьетнама [10], Украины [11], Канады [12] и других стран.

В связи с тем, что, как оказалось, наибольшей популярностью у наших читателей пользуются фундаментальные обзоры, именно эти статьи являются для нас в настоящее время приоритетными. Мы стараемся заказывать такие обзоры веду-

щим специалистам в соответствующих областях как из России, так и из-за рубежа.

Как уже отмечалось выше, в последнее время появляется все больше работ, выполненных на стыке нескольких специальностей. С учетом специфики нашего журнала мы теперь стараемся публиковать в том числе и статьи (как обзорные, так и экспериментальные), посвященные биологическим исследованиям, направленным на решение важных медицинских проблем, стоящих перед человечеством. В частности, недавно мы опубликовали несколько работ, посвященных: использованию раствора Карнуа и его модификаций для уменьшения количества рецидивов после хирургического удаления кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластом [13]; корреляции неполноценного питания в ранней жизни и риска развития диабета 2-го типа [11]; различным методическим аспектам использования биосовместимых полимеров в качестве тканеинженерных конструкций [14, 15]; изучению новых сплавов, перспективных в плане применения в создании костных имплантатов [12]; методам генной терапии, используемым при лечении врожденного буллезного эпидермолиза [16]; разработке экспериментальных клеточных систем для поиска лекарственных препаратов [17, 18].

Так как спектр областей науки, затрагиваемых в статьях, неизмеримо вырос (лет 10–15 назад мы в основном публиковали работы, выполненные методами классической биологии), независимое рецензирование поступающих в редакцию рукописей стало фактически наиболее трудоемкой частью нашей работы. Во-первых, сам поиск необходимых специалистов-рецензентов требует очень много сил и времени, т.к. большинство ученых сильно загружены собственными исследованиями и часто отказываются от рецензирования, а во-вторых, процесс многократного анонимного (по крайней мере — для авторов) обмена замечаниями и сделанными исправлениями между рецензентами и авторами статей может занимать несколько месяцев. У нас создана соответствующая база рецензентов (и мы чрезвычайно признательны всем коллегам за их неоценимую помощь), но мы, к сожалению, не можем к ним обращаться чаще, чем 1–2 раза в год, иначе они просто перестанут с нами сотрудничать. Так что поиск новых рецензентов идет постоянно. Ситуацию осложняет то обстоятельство, что иногда рецензенты, не имея времени на подробный анализ рукописи, просто присылают формальный положительный отзыв, который мы вынуждены не учитывать и посылаем статью еще одному специалисту. Все это приводит к определенным задержкам с публикацией работ.

Надо сказать, что процент рукописей, отклоняемых нами в режиме «rapid rejection» (т.е. до рецензирования), сильно вырос за последние несколько лет. В первую очередь это связано с тем,

что после того, как мы начали принимать статьи не только из МГУ, но из любых других научных учреждений, а наши наукометрические показатели выросли в несколько раз, в редакцию стало поступать много откровенно слабых работ, отклоненных другими изданиями или просто написанных авторами, для которых русский язык является неродным. Мы вынуждены в таких случаях сообщать авторам, что их рукопись не может быть рассмотрена редакцией и направлена на рецензирование без существенной лингвистической переработки. К сожалению, сходные проблемы возникают и с выполненной авторами статистической обработкой полученных результатов, которая часто является совершенно недостаточной. В результате в настоящее время мы без рецензирования отклоняем не менее 50% статей. С учетом значительного количества отрицательных рецензий эта цифра иногда достигает 80%.

Хотелось бы также сказать несколько слов о пристатейных списках литературы. Согласно требованиям международных наукометрических баз данных, ссылки в научных статьях должны быть доступными для ученых разных стран. Это означает, что читатель должен, во-первых, легко найти цитируемую работу в Интернете, а во-вторых, прочесть ее. Однако списки литературы во многих упомянутых «слабых» статьях часто состоят из перечня тезисов малоизвестных региональных русскоязычных конференций, ссылок на диссертации и малодоступные учебники или методические пособия. В результате при переводе рукописи на английский язык весь список литературы фактически становится нечитабельным, а ссылки оказываются недоступными для англоязычного читателя. Из-за этого мы приняли решение настоятельно рекомендовать нашим авторам использовать в пристатейных списках литературы главным образом те ссылки, которые легко могут быть найдены и прочтены нашими потенциальными читателями в Интернете. Ссылки на русскоязычные учебники и похожую литературу допускаются только в исключительных случаях, когда альтернативных англоязычных источников в принципе не существует.

Хотя мы по-прежнему принимаем статьи, посланные нам по электронной почте, значительная часть авторов теперь пользуется электронной редакцией на сайте <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru>. Она пока не обеспечивает всех возможностей, предоставляемых электронными редакциями больших международных издательств, но мы продолжаем работать над ее усовершенствованием.

В таблице приведены данные, касающиеся скачиваний статей с сайта Springer Nature (<https://link.springer.com/journal/11966>). Для каждого года указано пять наиболее популярных публикаций. Надо иметь в виду, что чем раньше опубликована статья, тем больше скачиваний у нее может быть

просто из-за того, что она дольше доступна читателям журнала, поэтому прямое сравнение статистики для разных лет не совсем корректно. Кроме того, данные по 2019 г. не являются полными, ибо не включают статьи из №4, которые к моменту сдачи данного обзора в печать еще не были размещены в Интернете. Интересно, что структура такого рода данных для статей из русскоязычной версии (<https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour>) сильно отличается от того, что можно видеть в таблице. Полагаем, что различия связаны, во-первых, с разницей в менталитете зарубежных и российских читателей, а во-вторых, с разным подходом к анализу популярности на этих сайтах. У Springer Nature анализируются только загрузки (downloads) полных текстов, при этом для тех, у кого нет подписки, такая загрузка всегда платная (независимо от даты публикации работы). На сайте же русскоязычной версии приводится только статистика просмотров (views) аннотаций статей. Кстати, загрузки русскоязычных статей являются бесплатными, однако становятся доступными лишь через год после публикации работ. Любопытно, что наибольшей популярностью у отечественных читателей (более 1600 просмотров) пользуется опубликованная еще в 2016 г. статья В. Н. Анисимова и Г. М. Жаринова, посвященная среднему возрасту смерти и долгожительству мужчин-ученых различных специальностей. У зарубежного читателя интерес к этой публикации неизмеримо меньше – судя по всему, его гораздо больше привлекают как обзорные, так и экспериментальные работы, затрагивающие серьезные прикладные медицинские и биотехнологические проблемы, перед решением которых человечество стоит в настоящее время.

Среди областей науки, наиболее часто затрагиваемых авторами нашего журнала – структурная биология [29–32], нейрокомпьютерные интерфейсы [27, 33, 34], геронтология [19, 22, 35, 36], различные аспекты вирусологических исследований [37, 38]. О статьях, посвященных биомедицинским исследованиям, уже было сказано выше. Мы также продолжаем уделять внимание работам, посвященным классическим биологическим исследованиям [9, 39]. Недавно нами даже была опубликована статья об изучении биологических объектов в космосе [40].

На сегодняшний день англоязычная версия нашего журнала, «Moscow University Biological Sciences Bulletin», имеет показатель CiteScore (импакт-фактор в Scopus), равный 0,62, и входит в квартиль Q3 во всех трех тематических рубриках, в которых индексируется – Agricultural and Biological Sciences; Biochemistry, Genetics and Molecular Biology; Environmental Science. Подробная информация доступна по следующим ссылкам:

<https://www.scopus.com/sourceid/21100204913>

<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=21100204913&tip=sid>

Таблица

Наиболее часто скачиваемые с сайта SpringerLink статьи из журнала «Moscow University Biological Sciences Bulletin» (2017–2019 гг.)

Год	Название статьи	Авторы	Количество загрузок на начало 2020 г.	Ссылка
2017	Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells	Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N.	397	[1]
	Does aging have a purpose?	Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.	253	[19]
	Purification of protein–DNA complexes by native gel electrophoresis for electron microscopy study	Valieva M.E., Derkacheva N.I., Sokolova O.S.	155	[20]
	Comparative analysis of the effect of stimulation with a binaural beat and similar kinds of sounds on the falling asleep process: A brief note	Shumov D.E., Arsen'ev G.N., Sveshnikov D.S., Dorokhov V.B.	110	[21]
	Malnutrition in early life and risk of type 2 diabetes: Theoretical framework and epidemiological evidence	Zabuga O.G., Vaiserman A.M.	103	[11]
2018	Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after	Khokhlov A.N.	288	[18]
	On choosing control objects in experimental gerontological research	Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.	257	[22]
	Role of reactive oxygen species in inflammation: A minireview	Chelombitko M.A.	158	[23]
	Impairment of the viability of transformed chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanoside is manifested only in the stationary phase of growth	Morgunova G.V., Klebanov A.A.	108	[24]
	Regulation of the actin cytoskeleton transformation in the cell by ARP2/3 complex. Review	Chemeris A.S., Vakhrusheva A.V., Derkacheva N. I., Sokolova O.S.	63	[25]
2019	Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase	Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.	78	[26]
	Corticospinal excitability in humans during motor imagery coupled with functional electrical stimulation	Yakovlev L.V., Syrov N.V., Morozova E.Yu., Kaplan A.Ya.	53	[27]
	The use of Carnoy's solution and its modifications for reducing the number of recurrences after surgical removal of keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas: a systematic review	Lebedev V.V., Butsan S.B.	53	[13]
	Decontamination of diatom algae cultures contaminated with the kinetoplastid <i>Bodo saltans</i> Ehrenberg, 1832	Davidovich N.A., Davidovich O.I., Podunay Yu.A., Polyakova S.L., Gastineau R.	48	[8]
	Comparative research into the effect of vitamins A and E on the differential leucocyte count and the morphometric parameters of lymphocytes in carnivorous mammals (Carnivora)	Baishnikova I.V., Uzenbaeva L.B., Ilyukha V.A., Kizhina A.G., Pechorina E.F., Ilyina T.N.	44	[28]

Надеемся, что рост наших нукометрических показателей продолжится и мы в ближайшее время войдем в квартиль Q2 хотя бы в одной тематической рубрике Scopus.

В заключение мы хотели бы пригласить к сотрудничеству коллег из самых разных организаций России и других стран в качестве как авторов публикуемых нами статей, так и членов

редакционной коллегии и редакционного совета журнала, расширение которых является одной из наших приоритетных задач на ближайшее время.

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов. Данные о скачивании статей (на начало февраля 2020 г.) взяты с официального сайта издательства «Шпрингер».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.
2. Dukhinova M.S., Ponomarev E.D. Role of platelets in neuroinflammatory disorders. A review // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 97–103.

3. Lyubitelev A.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Effect of sodium and potassium ions on conformation of linker parts of nucleosomes // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 3. P. 146–150.
4. Hsieh F.K., Kozlova A.L., Gerasimova N.S., Kotova E.Yu., Formosa T., Studitsky V.M. Role of the Nhp6 protein in in vitro transcription through the nucleosome // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 218–221.

5. *Feofanov A.V., Andreeva T.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P.* Reversibility of structural rearrangements in mononucleosomes induced by ionic strength // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 157–161.
6. *Malyuchenko N.V., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V.* PARP1 binding to DNA breaks and hairpins alters nucleosome structure // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 158–162.
7. *Yuzbekov A. K., Zuxun W.* Carbon dioxide exchange of woody plants in urban ecosystems // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 256–261.
8. *Davidovich N.A., Davidovich O.I., Podunay Yu.A., Polyakova S.L., Gastineau R.* Decontamination of diatom algae cultures contaminated with the kinetoplastid *Bodo saltans* Ehrenberg, 1832 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 63–68.
9. *Sokoloff D.D., Nuraliev M.S., Oskolski A.A., Remizova M.V.* Gynoecium evolution in angiosperms: monomery, pseudomonomery, and mixomery // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 3. P. 97–108.
10. *Tran Q.H.* The first data on the testate amoebae of the Coco River in the provinces of Quangnam and Danang, Vietnam // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 210–214.
11. *Zabuga O.G., Vaiserman A.M.* Malnutrition in early life and risk of type 2 diabetes: Theoretical framework and epidemiological evidence // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 1. P. 37–46.
12. *Soldatenko A.S., Karachevtseva M.A., Sheremetyev V.A., Kudryashova A.A., Arkhipova A. Yu., Andreev V.A., Prokoshkin S.D., Brailovski V., Moisenovich M.M., Shaitan K.V.* Features of in vitro interaction of osteoblast-like MG-63 cells with the surface of Ti-Zr-Nb shape memory alloys // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 250–255.
13. *Lebedev V.V., Butsan S.B.* The use of Carnoy's solution and its modifications for reducing the number of recurrences after surgical removal of keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas: a systematic review // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 108–116.
14. *Kotliarova M.S., Arkhipova A.Y., Moisenovich A.M., Kulikov D.A., Kulikov A.V., Kon'kov A.S., Bobrov M.A., Agapov I.I., Moisenovich M.M., Molochkov A.V., Goncharenko A.V.* Bioresorbable scaffolds based on fibroin for bone tissue regeneration // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 190–195.
15. *Bessonov I.V., Kotliarova M.S., Kopitsyna M.N., Fedulov A.V., Moisenovich A.M., Arkhipova A. Yu., Bogush V.G., Bagrov D.V., Ramonova A.A., Mashkov A.E., Shaitan K.V.* Photocurable hydrogels containing spidroin or fibroin // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 1. P. 24–27.
16. *Beylin A.K., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A.* Methods of gene therapy for treatment of inherited epidermolysis bullosa // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 191–198.
17. *Alpeeva E.V., Sidorenkova A.F., Vorotelyak E.A.* Overview of cell models: from organs cultured in a Petri dish to organs-on-chips // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 159–168.
18. *Khokhlov A.N.* Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
19. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* Does aging have a purpose? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 222–224.
20. *Valieva M.E., Derkacheva N.I., Sokolova O.S.* Purification of protein–DNA complexes by native gel electrophoresis for electron microscopy study // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 1. P. 1–5.
21. *Shumov D.E., Arsen'ev G.N., Sveshnikov D.S., Dorokhov V.B.* Comparative analysis of the effect of stimulation with a binaural beat and similar kinds of sounds on the falling asleep process: a brief note // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 1. P. 33–36.
22. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
23. *Chelombitko M.A.* Role of reactive oxygen species in inflammation: a minireview // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 199–202.
24. *Morgunova G.V., Klebanov A.A.* Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanidine is manifested only in the stationary phase of growth // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.
25. *Chemeris A.S., Vakhrusheva A.V., Derkacheva N. I., Sokolova O.S.* Regulation of the actin cytoskeleton transformation in the cell by ARP2/3 complex. Review // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 1. P. 1–6.
26. *Morgunova G.V., Karmushakov A.F., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Studies into the effect of “mild” uncoupling with 2,4-dinitrophenol on the growth of Chinese hamster cell culture and its subsequent dying out in the stationary phase // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 163–169.
27. *Yakovlev L.V., Syrov N.V., Morozova E.Yu., Kaplan A.Ya.* Corticospinal excitability in humans during motor imagery coupled with functional electrical stimulation // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 183–187.
28. *Baishnikova I.V., Uzenbaeva L.B., Ilyukha V.A., Kizhina A.G., Pechorina E.F., Ilyina T.N.* Comparative research into the effect of vitamins A and E on the differential leucocyte count and the morphometric parameters of lymphocytes in carnivorous mammals (Carnivora) // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 49–56.
29. *Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan, K.V., Sokolova O.S.* Molecular modeling of the tetramerization domain of human potassium channel Kv10.2 in different oligomeric states // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 69–73.
30. *Gribkova A.K., Armeev G.A., Shaytan A.K.* Investigation of histone–DNA binding energy as a function of DNA unwrapping from nucleosome using molecular modeling // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 3. P. 142–145.
31. *Chertkov O.V., Valieva M.E., Malyuchenko N.V., Feofanov A.V.* Analysis of nucleosome structure in polyacrylamide gel by the Förster resonance energy transfer method // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 196–200.
32. *Bass M.V., Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* The effect of oncomutations and posttranslational modifications of histone H1 on chromatosome structure and stability // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 121–126.
33. *Grigoryan R.K., Krysanova E.U., Kirjanov D.A., Kaplan A.Ya.* Visual stimuli for P300-based brain-computer interfaces: color, shape, and mobility // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 92–96.
34. *Lukoyanov M.V., Gordileeva S.Y., Grigorev N.A., Savosenkov A.O., Lotareva Y.A., Pimashkin A.S., Kaplan A.Y.* In-

vestigation of characteristics of a motor-imagery brain-computer interface with quick-response tactile feedback // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 4. P. 222–228.

35. Khokhlov A.N. The immortality of the germ line: the neverending story // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 4. P. 189–193.

36. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures story // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.

37. Kondakova O.A., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 169–178.

38. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Arkhipenko M.V., Donchenko E.K., Atabekov J.G., Karpova O.V. Comparative study of thermal remodeling of viruses with icosahedral and

helical symmetry // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 179–183.

39. Kuzmina T.V., Temereva E.N. Rejection mechanism of plectolophous lophophore of brachiopod *Coptothyris grayi* (Terebratulida, Rhynchonelliformea) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 136–141.

40. Ponizovskaya V.B., Dyakov M.Y., Antropova A.B., Bilanenko E.N., Mokeeva V.L., Ilyin V.K. The survival of microfungi exposed to space conditions // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 6–12.

Поступила в редакцию
03.12.2019 г.

После доработки
16.01.2020 г.

Принята в печать
03.02.2020 г.

EDITORIAL

OUR JOURNAL – 2020: WHAT AND HOW WE PUBLISH

M.P. Kirpichnikov¹, G.V. Morgunova², A.N. Khokhlov^{2,*}

¹Department of Bioengineering and ²Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

This is a brief review of the latest changes in the editorial policy and content of the journal “Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 16: Biologiya” with special emphasis on the situation with its English-language version – “Moscow University Biological Sciences Bulletin”. The current strategy of the editorial board for evaluation of the submitted manuscripts, their rejection, peer reviewing and editing, as well as the distribution of papers among new sections of the journal are described. The article discusses the requirements for the language of articles, compilation of reference lists, and statistical analysis of the data obtained by the authors. Information is provided on the growth of scientometric indicators of the journal in recent years, as well as a list of databases in which the periodical is currently indexed. Differences in interest in published articles between foreign and domestic readers are noted. Data on the number of downloads of the most popular articles from the Springer Nature website are provided. The article analyzes the topics of articles published in the journal in 2017–2019. The authors emphasize the priority for the editorial board of reviews affecting both fundamental and applied aspects of research in the field of biology, biomedicine, and biotechnology.

Keywords: scientific publications, editorial policy, peer review, reference lists, scientometric indicators, article downloads, “Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya 16: Biologiya”, “Moscow University Biological Sciences Bulletin”, review

Сведения об авторах

Кирпичников Михаил Петрович – академик РАН, проф., докт. биол. наук, декан и зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, главный редактор журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология / Moscow University Biological Sciences Bulletin». Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Моргунова Галина Васильевна – научный сотрудник сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ, ответственный секретарь журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология / Moscow University Biological Sciences Bulletin». Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Хохлов Александр Николаевич – докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ, зам. главного редактора журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология / Moscow University Biological Sciences Bulletin». Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.3

**ФОТОВЫЦВЕТАНИЕ МОЛЕКУЛ ФТАЛОЦИАНИНОВ
В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСА С КОЛЛОИДНЫМИ КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ****Д.А. Гвоздев*, Е.Г. Максимов, В.З. Пашенко***Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24***email: danil131054@mail.ru*

В настоящее время флуоресцентные наночастицы рассматриваются как перспективные усилители фотодинамической активности традиционных фотосенсибилизаторов в процедурах фотодинамической терапии рака и инактивации патогенных микроорганизмов. С одной стороны, такие наночастицы выступают в качестве наноплатформы селективной доставки молекул красителя к клеткам-мишеням, с другой — как светособирающие антенны, способствующие увеличению поглощательной способности красителя. В работе изучено влияние полупроводниковых CdSe/ZnS квантовых точек, покрытых полимерной оболочкой, на фотостабильность поликатионных фталоцианинов цинка и алюминия. Показано, что в комплексе с квантовой точкой скорость фотовыцветания фталоцианинов значительно возрастает как при прямом возбуждении фталоцианина красным светом, так и при опосредованной квантовой точкой накачке синим светом. Данный эффект может объясняться тем, что внутри полимерной оболочки квантовой точки фталоцианин становится основной мишенью для активных форм кислорода. Скорость выцветания химической ловушки активных форм кислорода 4-нитрозо-N,N-диметиланилина в растворе фталоцианина увеличивается в присутствии квантовой точки при освещении раствора красным светом. Мы считаем, что химическая ловушка концентрируется в полимерной оболочке квантовой точки, что приводит к увеличению вероятности ее повреждения активными формами кислорода, генерируемыми фталоцианином. Поскольку диффузия активных форм кислорода из полимерной оболочки наночастицы в окружающий раствор затруднена, применение квантовых точек в качестве усилителя фотодинамического действия фталоцианинов может быть эффективным только при отсутствии значительных стерических препятствий для диффузии активных форм кислорода к молекулам — мишеням фотодинамической инактивации.

Ключевые слова: фотовыцветание, фталоцианин, квантовая точка, химическая ловушка, активные формы кислорода, имидазол

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АФК — активные формы кислорода

ИА — имидазол

КТ — квантовая точка

НДМА — 4-нитрозо-N,N-диметиланилин

ФДИ — фотодинамическая инактивация

ФДТ — фотодинамическая терапия

ФС — фотосенсибилизатор

Фц — фталоцианин

FRET — Forster Resonance Energy Transfer

Фталоцианины являются одними из наиболее распространенных фотосенсибилизаторов (ФС), применяющихся в процедурах фотодинамической терапии раковых заболеваний (ФДТ) [1] и фотодинамической инактивации (ФДИ) патогенных микроорганизмов [2]. Данные соединения обладают интенсивной полосой поглощения в красной области спектра (рис. 1) и при оптимальных условиях освещения генерируют активные формы кислорода (АФК) с высоким выходом. По своим фотофизическим характеристикам фталоцианины относят к фотосенсибилизаторам «второго поколения».

Развитие концепции высокоэффективных ФС для задач ФДТ и ФДИ предусматривает синтез

препаратов «третьего поколения», главным преимуществом которых перед ФС предыдущего поколения станет селективность действия препарата и его направленная доставка к клеткам-мишеням [3]. Осуществлять такую доставку предлагается с помощью наноплатформ, которые а) концентрируют молекулы действующего вещества (ФС) и б) обладают повышенным сродством к мишени воздействия (наноплатформа как вектор) [4].

В качестве таких платформ могут выступать плюроники, липосомы и частицы иных типов, модифицированные антителами, олигопептидами и другими векторными молекулами. Наиболее перспективными наноплатформами являются флуоресцентные наночастицы, которые, помимо основных свойств, необходимых для направленной доставки ФС, обладают дополнительной функциональностью. Так, наличие флуоресценции у наночастиц позволяет осуществлять диагностику во время процедур ФДТ (тераностика). Кроме того, флуоресцентные наночастицы могут использоваться как донорные светособирающие антенны для молекул ФС за счет переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму [5].

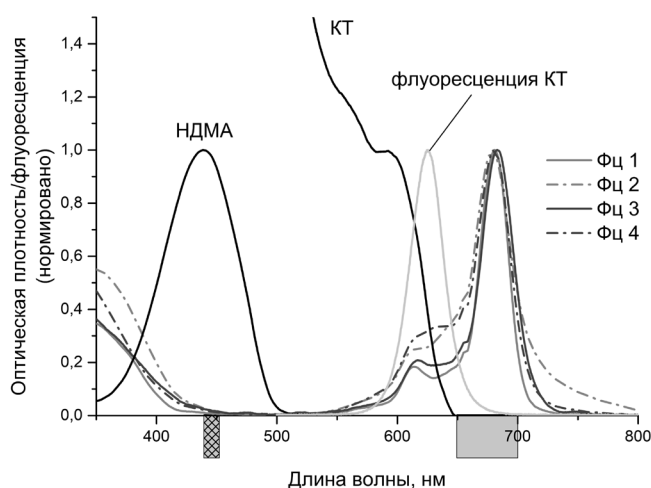


Рис. 1. Нормированные спектры поглощения использованных в работе Фц, КТ и химической ловушки НДМА. Отдельно добавлен спектр флуоресценции КТ. Отмечен диапазон длин волн селективного освещения Фц и КТ (соответственно серый прямоугольник и серый прямоугольник со штриховкой под шкалой длин волн)

Нужно отметить, что для фталоцианинов, как и для других органических красителей, свойственно явление фотовыцветания, вызванное, как правило, повреждением молекулы активными формами кислорода, образующимися при фотовозбуждении красителя. В результате фотовыцветания фотодинамическая активность ФС может снизиться из-за уменьшения концентрации действующего вещества. В связи с этим фактом немаловажное значение имеет изучение фотовыцветания ФС в составе векторных наноплатформ. В данной работе мы оценили скорость фотовыцветания поликатионных фталоцианинов (Фц) цинка и алюминия, встроенных в наноплатформу на основе полупроводниковой квантовой точки (КТ), покрытой полимерной оболочкой. Вследствие высокой цитотоксичности материалов на основе тяжелых металлов система «КТ–Фц» не пригодна для задач ФДТ и рассматривается нами исключительно как модельная. Мы показали, что скорость деградации молекул Фц, локализованных в полимерной оболочке КТ, существенно возрастает по сравнению со скоростью деградации молекул Фц в водном растворе.

Материалы и методы

Холинилзамещенные Фц а) со средней степенью замещения 4–5 (1) и 6–7 (2), алюминийевые, и б) со средней степенью замещения 5 (3) и 8 (4), цинковые, были предоставлены ФГУП ГНЦ «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей» (Россия). В качестве наноплатформы и донора энергии для увеличения эффективного сечения поглощения Фц в видимой области спектра использовали квантовые точки с ядром из CdSe/ZnS производства ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна» (Россия). КТ имели оболочку из полимера, модифицированного карбоксильными

группами, так что между КТ и Фц в водном растворе образовывался комплекс за счет электростатических взаимодействий. Гидродинамический размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на приборе ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). В качестве химической ловушки АФК использовали двухкомпонентную систему «имидазол – 4-нитрозо-N,N-диметиланилин» (ИА–НДМА) [6].

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра MayaPro (Ocean Optics, США) и стабилизированного источника белого света с вольфрамовой лампой SLS201L (Thorlabs, США). Для регистрации стационарных спектров флуоресценции использовали CCD-спектрометр FLAME (Ocean Optics, США). В качестве растворителя использовали 10 мМ натрий-фосфатный буфер (Sigma, Германия). Спектрофотометрические измерения проводили в кварцевой кювете объемом 100 мкл.

Кинетики затухания флуоресценции КТ и Фц с пикосекундным временным разрешением регистрировали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета SimpleTau-140 (Becker & Hickl, Германия). Для возбуждения флуоресценции КТ использовали светодиодный лазер PLS-445/660 (InTop, Россия): длительность импульса 25 пс, частота следования импульсов 25 МГц, длина волны возбуждения флуоресценции 445 нм. Сигнал флуоресценции поступал на полихроматор MS 125 (Becker & Hickl, Германия). Далее флуоресценцию регистрировали в режиме счета фотонов с помощью 16-канального детектора PML-16-1-C (Becker & Hickl, Германия) в диапазоне 600–700 нм при использовании дифракционной решетки с разрешением 6,25 нм/канал.

Селективное освещение Фц производили в красной области спектра с использованием белого светодиода MCWHLPL1 (Thorlabs, США), излучение которого ограничивали светофильтрами в диапазоне 650–700 нм и фокусировали с помощью полусферической собирающей линзы в объеме кюветы. Мощность источника составила 50 мВт/см².

Для исследования динамики изменений оптической плотности или флуоресценции растворов Фц, КТ и НДМА использовали программное обеспечение Spectrasuite (Ocean Optics, США). Эксперимент проводили в термостатируемой ячейке Qpod 2e (Quantum Northwest, США) при температуре 25°C. Все вычисления проводили с помощью пакета программ OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Все использованные в работе Фц способны к образованию комплекса с КТ в буферном растворе. Об образовании комплекса судили по туше-

нию флуоресценции КТ в присутствии Фц. Для объяснения механизма тушения флуоресценции КТ обычно используют теорию индуктивно-резонансного переноса энергии (Forster Resonance Energy Transfer, FRET), которая, в целом, удовлетворительно описывает безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения в системах «КТ–краситель». Спектр флуоресценции КТ имеет максимум на длине волны 623 нм и хорошо перекрывается со спектром поглощения Фц в области их длинноволновой полосы поглощения Q_{II} (рис. 1), что является необходимым условием резонанса. Эффективность переноса энергии W является функцией расстояния между донором и акцептором в шестой степени и быстро убывает с его увеличением. Величину W можно оценить, регистрируя изменение длительности флуоресценции КТ при добавлении акцептора энергии (фталочина) с помощью спектроскопии высокого временного разрешения. Среднее значение длительности флуоресценции КТ в отсутствие Фц составило 16,8 нс. В присутствии Фц снижаются как интенсивность, так и длительность флуоресценции КТ; на основе полученных данных для соотношения $[Фц]:[КТ] = 3:1$ были рассчитаны некоторые параметры энергетического взаимодействия (эффективность переноса энергии, интеграл перекрывания спектров и среднее расстояние между молекулами Фц и КТ в комплексе). Данное стехиометрическое соотношение использовали по причине наибольшей эффективности метода при сопоставимых количествах молекул донора и акцептора энергии в комплексе. Значения рассчитанных параметров для всех пар Фц–КТ приведены в таблице. Видно, что характерные значения расстояния между флуоресцирующим ядром КТ и Фц составляют порядка 5–6 нм. В то же время, гидродинамический радиус наночастицы составляет $25,5 \pm 1,2$ нм. Это означает, что молекулы Фц локализуются глубоко внутри полимерной оболочки КТ.

При образовании комплекса «КТ–Фц» происходит батохромный сдвиг спектра поглощения

Фц в красной области спектра, который, очевидно, вызван взаимодействием молекул Фц с полимерными цепями, окружающими полупроводниковое ядро КТ. Нужно отметить, что при данном стехиометрическом отношении Фц:КТ практически все молекулы Фц находятся в связанном с КТ состоянии; так, полуширина полосы Q_I поглощения Фц в однокомпонентном растворе и в комплексе с КТ составила 20 и 22 нм соответственно.

При освещении раствора Фц/КТ красным светом мы обнаружили уменьшение оптической плотности в области поглощения Фц (фотовыцветание). При этом флуоресценция КТ, потушенная в результате первоначального добавления Фц, восстанавливается, очевидно, вследствие уменьшения концентрации тушителя (рис. 2). Восстановление флуоресценции КТ наблюдается и при освещении раствора Фц/КТ синим лазером без дополнительной селективной накачки Фц, поскольку в этих условиях Фц также генерирует АФК в результате переноса энергии от КТ. Параллельно наблюдающееся снижение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции Фц не вызвано дезинтеграцией комплекса, так как спектр поглощения Фц, испытавший батохромный сдвиг в результате взаимодействия с КТ, в процессе выцветания Фц не изменяет своего положения. Отметим, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции Фц в течение первых минут освещения увеличивается (рис. 2). Ранее мы показали, что увеличение концентрации Фц в составе комплекса с КТ (начиная с соотношения Фц:КТ = 1:1) приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции Фц вследствие концентрационных эффектов [7]. Таким образом, уменьшающееся в результате фотовыцветания Фц соотношение Фц:КТ должно способствовать усилению сенсibilизированной флуоресценции Фц; при уменьшении соотношения Фц:КТ ниже 1:1 влияние концентрационных эффектов исчезает, и наблюдается уменьшение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции Фц.

Таблица

Параметры переноса энергии (FRET), рассчитанные для комплексов «КТ–Фц» ($[Фц]:[КТ] = 3:1$): J – интеграл перекрывания спектров поглощения Фц и флуоресценции КТ, W – эффективность переноса энергии, R – расстояние между КТ и Фц в комплексе. Также приведены значения констант скоростей выцветания Фц $k_{фц}$ и НДМА $k_{ндма}$ (10^{-5} с^{-1}) в буферном растворе в присутствии различных компонентов комплекса. Обозначения: Фц 1 и Фц 2 – алюминиевые фталочинаны с зарядом +4,5 и +6,5 соответственно, Фц 3 и Фц 4 – цинковые фталочинаны с зарядом +5 и +8 соответственно

	Фц 1	Фц 2	Фц 3	Фц 4
$J, \cdot 10^{-13} \text{ см}^6$	2,95	7,47	3,38	3,97
$W, \%$	57,4	43,5	41,5	78,7
$R, \text{ \AA}$	60	77	68	53
$k_{фц}$	$9,68 \pm 0,08$	$9,6 \pm 1,1$	$34,7 \pm 0,2$	26 ± 1
$k_{фц}, + \text{ИА–НДМА}$	$13,8 \pm 0,2$	$12,1 \pm 0,2$	104 ± 2	103 ± 3
$k_{фц}, + \text{КТ}$	$15,8 \pm 0,2$	$19,3 \pm 0,2$	106 ± 3	133 ± 2
$k_{фц}, + \text{КТ/ИА–НДМА}$	$12,8 \pm 0,1$	$14,3 \pm 0,3$	22 ± 2	11 ± 1
$k_{ндма}, + \text{Фц}$	105 ± 4	45 ± 2	102 ± 2	137 ± 15
$k_{ндма}, + \text{Фц/КТ}$	244 ± 9	328 ± 8	102 ± 2	241 ± 7

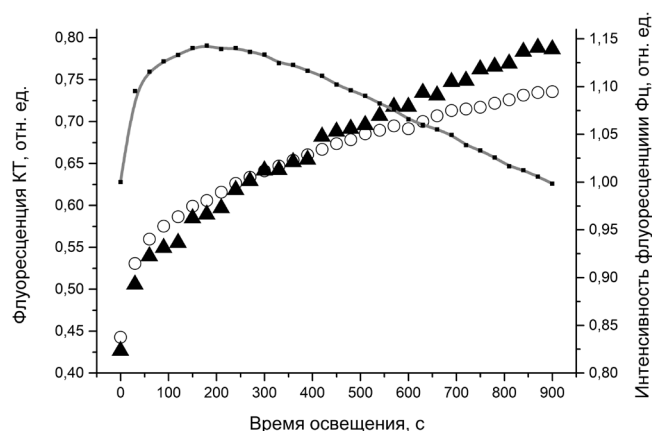


Рис. 2. Восстановление интенсивности I (○) и длительности τ (▲) флуоресценции КТ, а также изменение интенсивности флуоресценции Фц I при освещении раствора Фц/КТ красным светом. Интенсивность сенсibilизированной флуоресценции Фц (сплошная кривая; соответствующая ей ось ординат расположена справа) нормирована на ее значение в растворе Фц/КТ в момент начала освещения; интенсивность и длительность флуоресценции КТ нормированы на их значения I_0 и τ_0 в растворе КТ без Фц

Мы сравнили скорость фотовыцветания Фц, локализованного в полимерной оболочке КТ, и Фц в отсутствие КТ (таблица). В однокомпонентном растворе цинковые Фц выцветают быстрее алюминиевых. Поскольку корреляция между скоростью фотовыцветания и выходом АФК для Фц не выявлена [8], невысокая фотостабильность цинковых Фц может быть связана с большей уязвимостью молекулы к атаке АФК. Также видно, что увеличение количества функциональных групп, определяющих заряд Фц, способствует снижению скорости фотовыцветания (данный эффект ярко выражен у цинковых Фц как в целом менее стабильных). В присутствии КТ скорость фотовыцветания Фц значительно увеличивается; больший прирост скорости наблюдается для цинковых Фц и положительно коррелирует с зарядом Фц. Мы считаем, что диффузия АФК, образованных в результате взаимодействия молекулярного кислорода и Фц в возбужденном триплетном состоянии, внутри полимерной оболочки КТ затруднена по сравнению с диффузией АФК в водном растворе. Следовательно, вероятность повреждения молекул Фц, находящихся в непосредственной близости к АФК, должна возрасти. Чтобы оценить концентрацию АФК внутри полимерной оболочки КТ, мы использовали химическую ловушку АФК, состоящую из двух компонентов. АФК непосредственно взаимодействуют с имидазолом (ИА), что приводит к образованию его окисленных интермедиатов. В свою очередь, данные интермедиаты взаимодействуют с окрашенным соединением НДМА, которое в результате реакции выцветает. Систему ИА–НДМА можно использовать для определения концентрации АФК в полимерной оболочке КТ, поскольку оба эти соединения также взаимодействуют с КТ. В присутствии КТ спектр поглощения НДМА испытывает батохромный сдвиг на $4,7 \pm 1$ нм без из-

менения полуширины спектра, что может свидетельствовать об изменении микроокружения молекул НДМА. Кроме того, в присутствии КТ мы наблюдали значительное увеличение оптической плотности в области поглощения НДМА. Это может быть связано с более высокой растворимостью данного соединения в органической фазе. Поскольку ИА не является окрашенным соединением, мы не можем выявить его локализацию на основе спектральных измерений. Однако нужно заметить, что выцветание НДМА наблюдается только в присутствии ИА, и высокую скорость обесцвечивания НДМА в связанном с КТ состоянии (при наличии Фц и актиничного света) было бы трудно объяснить при локализации ИА вне КТ. Кроме того, в присутствии ИА изменяются флуоресцентные характеристики КТ: интенсивность и длительность флуоресценции увеличиваются на $\sim 30\%$, спектр флуоресценции испытывает гипсохромный сдвиг на 1 нм. Выяснение механизма данного эффекта требует дополнительных исследований.

Скорости выцветания НДМА в растворах Фц и Фц/КТ приведены в таблице. Из нее следует, что для всех пар Фц–КТ (кроме Фц 3) скорость выцветания НДМА в растворе комплекса «Фц–КТ» оказывается выше, чем в растворе Фц без КТ. Несмотря на то, что изменение скорости выцветания химической ловушки в косвенных методах регистрации АФК связывается с изменением равновесной концентрации АФК, в данном случае мы считаем, что увеличение скорости выцветания НДМА в первую очередь вызвано концентрированием реагентов внутри органической оболочки КТ. Так, при имеющихся концентрациях реагентов в растворе (100 нМ КТ, 12 мМ ИА и 20 мкМ НДМА) в среднем на одну наночастицу приходится 500 молекул НДМА и 30 тыс. молекул ИА. Если предположить, что весь ИА в растворе находится в связанном с КТ состоянии (что точно установлено для НДМА), локальные концентрации реагентов в комплексе с КТ оказываются крайне высокими.

Увеличение локальной концентрации молекул-тушителей АФК имеет большое значение, поскольку АФК обладают ограниченным радиусом действия; так, средний пробег молекулы синглетного кислорода, являющегося основным продуктом фотодинамической активности Фц, в воде составляет несколько десятков нанометров [9]. Следовательно, эффективное повреждение молекул ИА возможно только в случае близкой локализации ИА к источнику АФК (Фц в комплексе с КТ). Известно, что ИА способен образовывать монолигандный комплекс с Фц в растворе путем координирования на атом металла в макроцикле Фц [10]. Нами показано, что ИА может непосредственно взаимодействовать с Фц и в полимерной оболочке КТ. При добавлении ИА в концентрации 12 мМ в раствор Фц (1,5 мкМ) мы наблюдали гипсохромный сдвиг спектра поглощения алюми-

ниевых Фц и батохромный сдвиг спектра поглощения цинковых Фц на ~0,5 и ~1 нм соответственно. В полимерной оболочке КТ, где спектр поглощения Фц оказывается смещен в красную область по сравнению с Фц в водном растворе, при добавлении ИА в той же концентрации наблюдается гипсохромный сдвиг полосы Q_1 поглощения всех Фц на ~1 нм; при этом оптическая плотность в области поглощения Фц несколько возрастает. По-видимому, присутствие ИА вызывает уменьшение прочности связей молекул Фц с полимерными цепями КТ, однако молекулы Фц не покидают комплекс.

Близкая локализация образующихся интермедиатов ИА к молекуле Фц может способствовать повреждению последней; действительно, в присутствии ИА скорость фотовыцветания Фц в буферном растворе возрастает (таблица). Однако если Фц при этом находится в комплексе с КТ, скорость фотовыцветания Фц, наоборот, снижается. Вероятно, данный эффект объясняется высокой локальной концентрацией НДМА в оболочке КТ и эффективной конкуренцией НДМА с Фц за интермедиаты ИА. Отметим, что присутствие НДМА не оказывает влияния на спектральные свойства Фц в буферном растворе или в комплексе с КТ.

Таким образом, при создании платформ для доставки молекул ФС к мишеням воздействия необходимо учитывать функциональное состояние действующего вещества в микроокружении, создаваемом наноплатформой. Если при осуществлении успешной доставки молекулы ФС, локализованные на наноплатформе, будут подвергаться освещению, эффективность действия ФС на биологические мишени может быть крайне низкой, поскольку образующиеся АФК будут повреждать в первую очередь молекулы ФС. Однако известно, что при увеличении концентрации Фц в составе комплекса с полупроводниковыми КТ, покрытыми полимерной оболочкой, скорость образования АФК существенно уменьшается вследствие концентрационных эффектов [11]. Важно, что данный эффект продемонстрирован для Фц в мономерной форме; некоторые Фц в высокой концентрации подвергаются димеризации при связывании с КТ [12], что должно привести к дополнительному снижению скорости образования АФК фотосенсибилизатором в составе наноплатформы. Следовательно, в условиях *in vivo* высокая концентрация ФС в составе векторной платформы должна способствовать уменьшению вероятности потери действующего вещества в результате фотовыцветания, так как в таких условиях образо-

вание АФК ингибировано. В данной работе мы не использовали высокие соотношения Фц:КТ, поскольку для изучения фотовыцветания ФС требуется эффективная генерация АФК.

С другой стороны, для увеличения эффективности фотодинамического действия ФС необходимо а) добиться полной разгрузки наноплатформы вблизи мишени воздействия либо б) обеспечить локализацию молекул ФС в поверхностном слое наноплатформы для более эффективной диффузии образующихся АФК в окружающий раствор. Этим особенностям должно быть уделено большое внимание при подборе компонентов для создания наноплатформы и оптимизации ее дизайна. Наличие же флуоресцирующего ядра в составе наноплатформы может стать дополнительным инструментом диагностики функционального состояния ФС в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, восстановление флуоресценции КТ при инкубации комплекса «КТ–Фц» с биологическими объектами может свидетельствовать а) о фотовыцветании Фц в составе комплекса или б) о выходе Фц из комплекса во внешнюю среду, поскольку в таком случае расстояние между Фц и КТ оказывается слишком большим для осуществления переноса энергии по механизму FRET. Эти процессы можно разделить, регистрируя флуоресценцию Фц при возбуждении в области поглощения КТ, так как сенсibilizированная флуоресценция Фц в случае «а» должна усиливаться при уменьшении соотношения Фц:КТ, а в случае «б», наоборот, уменьшаться вследствие дезинтеграции комплекса с переносом энергии.

В данной работе была исследована фотостабильность замещенных металлофталочининов в составе комплекса с КТ, покрытой полимерной оболочкой, для моделирования поведения Фц в составе наноплатформы для доставки ФС к мишени воздействия. При встраивании молекул Фц в полимерную оболочку наночастицы скорость фотовыцветания Фц увеличивается вследствие высокой концентрации АФК, образованных Фц, в оболочке КТ. Данный эффект необходимо учитывать при разработке систем доставки молекул ФС в процедурах фотодинамической терапии рака и инактивации микроорганизмов.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ (проект № АААА-А16-116021660035-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Annunzio S.R., Costa N.C.S., Mezzina R.D., Graminha M.A.S., Fontana C.R. Chlorin, phthalocyanine, and porphyrin types derivatives in phototreatment of cutaneous manifestations: A review // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. N 16: 3861.

2. Ghorbani J., Rahban D., Aghamiri S., Teymouri A., Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview // Laser Ther. 2018. Vol. 27. N 4. P. 293–302.

3. Martinez De Pinillos Bayona A., Mroz P., Thunshelle C., Hamblin M.R. Design features for optimization of

tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers // *Chem. Biol. Drug Des.* 2017. Vol. 89. N 2. P. 192–206.

4. Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M.L., Guillemain F., Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents // *Trends Biotechnol.* 2008. Vol. 26. N 11. P. 612–621.

5. Samia A.C.S., Dayal S., Burda C. Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* 2006. Vol. 82. N 3. P. 617–625.

6. Kraljic I., Moshni S.E. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions // *Photochem. Photobiol.* 1978. Vol. 28. P. 577–581.

7. Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Strakhovskaya M.G., Ivanov M. V., Paschenko V.Z., Rubin A.B. The effect of ionic strength on spectral properties of quantum dots and aluminum phthalocyanine complexes // *Nanotechnol. Russ.* 2017. Vol. 12. N 1–2. P. 73–85.

8. Kuznetsova N.A., Makarov D.A., Yuzhakova O.A., Solovieva L.I., Kaliya O.L. Study on the photostability of water-soluble Zn (II) and Al (III) phthalocyanines in aqueous solution // *J. Porphyr. Phthalocyanines*. 2010. Vol. 14. N 11. P. 968–974.

9. Krasnovsky A.A. Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // *Membr. Cell Biol.* 1998. Vol. 12. N 5. P. 665–690.

10. Zaitseva S.V., Zdanovich S.A., Koifman O.I. Coordination properties of (chloro)aluminum-5,15-Diphenyloctaalkylporphyrin in the reactions with small organic molecules // *Russ. J. Coord. Chem.* 2010. Vol. 36. N 5. P. 323–329.

11. Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Strakhovskaya M.G., Moysenovich A.M., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Goryachev S.N., Paschenko V.Z., Rubin A.B. A CdSe/ZnS quantum dot-based platform for the delivery of aluminum phthalocyanines to bacterial cells // *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2018. Vol. 187. P. 170–179.

12. Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A.V., Berwick K., Baranov A.V. The influence of phthalocyanine aggregation in complexes with CdSe/ZnS quantum dots on the photophysical properties of the complexes // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016. Vol. 7. N 1. P. 1018–1027.

Поступила в редакцию
09.10.2019 г.

После доработки
11.12.2019 г.

Принята в печать
25.12.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

PHOTBLEACHING OF PHTHALOCYANINES IN THE COMPLEX WITH COLLOIDAL QUANTUM DOTS

D.A. Gvozdev*, E.G. Maksimov, V.Z. Paschenko

Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*email: danil131054@mail.ru

Currently, fluorescent nanoparticles are considered as promising enhancers of photodynamic activity of traditional photosensitizers in the procedures of photodynamic therapy of cancer and inactivation of pathogens. On the one hand, such nanoparticles act as a nanoplatform for target delivery of dye molecules to cells, on the other – as light-harvesting antennas that increase the effective absorption cross-section of the dye. In this paper the influence of semiconductor CdSe/ZnS quantum dots coated with a polymer shell on the photostability of zinc or aluminum polycationic phthalocyanines was studied. It was shown that in presence of the quantum dots the rate of photobleaching of phthalocyanines increases significantly both with direct illumination of phthalocyanine by red light and with the quantum dot-mediated illumination by blue light. This effect can be explained by the fact that phthalocyanine is the primary target for the attack of reactive oxygen species inside the polymer shell of the quantum dot. The rate of bleaching of chemical trap of the reactive oxygen species 4-nitroso-N,N-dimethylaniline in phthalocyanine solution increases in the presence of the quantum dot under red light illumination. We believe that the chemical trap is concentrated in the polymer shell of the quantum dot, which increases the probability of its damage by active oxygen species generated by the phthalocyanine. Since the diffusion of reactive oxygen species from the polymer shell of a nanoparticle into the surrounding solution is slow, the use of quantum dots as an enhancer of the photodynamic action of phthalocyanines can be effective only in the absence of significant steric obstacles to the diffusion of reactive oxygen species to the target molecules of photodynamic inactivation.

Keywords: photobleaching, phthalocyanine, quantum dot, chemical trap, reactive oxygen species, imidazole

Сведения об авторах

Гвоздев Даниил Александрович – науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-985-307-94-21; e-mail: danil131054@mail.ru

Максимов Евгений Георгиевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-735-04-37; e-mail: emaksimoff@yandex.ru

Пасченко Владимир Захарович – докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-905-564-43-37; e-mail: vz.paschenko@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 572.5

**ЭПОХАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОТИПА СОВРЕМЕННОГО ЧЕЛОВЕКА
(ПО АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИМ ДАННЫМ
РЕТРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОСКОВСКОЙ МОЛОДЁЖИ)****М.А. Негашева*, С.Н. Зимина, А.А. Хафизова, Р.Э. Сиразетдинов, И.М. Синева***Кафедра антропологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: negasheva@mail.ru*

На материалах антропометрического обследования более 6300 студентов младших курсов различных факультетов МГУ изучена динамика показателей телосложения у юношей и девушек в начале XXI в. (2000–2018 гг. обследования). Проведено ретроспективное сравнение тотальных размеров тела московской молодежи, обследованной в разные годы, начиная с конца 1920-х гг. В течение последних 80 лет — до начала XXI в. — у 17–18-летних юношей и девушек Москвы наблюдался процесс эпохального увеличения длины тела. С начала 2000-х гг. до настоящего времени у обоих полов отмечена относительная стабильность этого показателя. На фоне эпохального увеличения массы тела, которое продолжается в настоящее время, выявлены гендерные особенности темпов роста этого показателя. С позиций микроэволюционных изменений отмеченные тенденции можно рассматривать как следствие меняющегося образа жизни современного населения. Наряду с эпохальными изменениями размеров тела для обоих полов отмечена трансформация головы и лица, которая выражается в процессах дебрахицефализации (уменьшение головного указателя) и лептопрозопии (увеличение лицевого указателя). Наблюдаемые секулярные (межпоколенные) изменения морфотипа современной молодежи могут служить маркером происходящих в обществе процессов социально-экономических преобразований и имеют важное значение для фундаментальной биологии, социологии и профилактической медицины.

Ключевые слова: антропология, длина и масса тела, морфотип, эпохальные изменения, секулярный тренд, студенческая молодежь

Исследованию эпохальных изменений размеров тела (в первую очередь, длины и массы тела) у детей и взрослых посвящено большое количество публикаций [1–5]. Показано, что с 1880 по 1980 гг. длина тела молодых мужчин увеличилась во всех европейских странах, но величина этого прироста значительно варьирует: с 3,7 см в Португалии до 15,1 см в Нидерландах [5]. У женщин темпы увеличения длины тела значительно ниже, чем у мужчин: во второй половине XX в. они варьировали от 1,0 см (в Англии) до 3,0 см (Чехия) в декаду [6]. Увеличение длины тела в конце XX в. также наблюдалось и для представителей неевропейских регионов. Показано, что после 1950-х гг. длина тела последовательно увеличивалась у юношей и девушек Японии, Кубы, Бразилии, Австралии, Мексики [7].

Вместе с секулярным (межпоколенным) увеличением длины тела у детей, подростков и студенческой молодежи некоторых стран Европы, нашей страны и ряда других стран бывшего социалистического лагеря, в 80–90-е гг. прошлого века были выявлены отчетливые тенденции к астенизации (от греч. *asthenia* — слабость) телосложения: снижение веса, уменьшение обхватных размеров и толщины подкожного жирового слоя [1].

В начале 2000-х гг. появились данные о замедлении процессов увеличения длины тела [8]. Наряду с этим, население многих развитых стран в конце XX — начале XXI в. охватила эпидемия ожирения [9]. В исследованиях последних лет показано увеличение частоты встречаемости гиперлипидозности в детском и юношеском возрасте не только в экономически развитых, но и в развивающихся странах [10].

Приведенные факты говорят об интенсивно протекающих процессах трансформации морфофункционального статуса у детей, подростков и молодежи в разных странах мира. Понимание того, насколько это может сказаться на здоровье и физическом развитии подрастающего поколения, представляется важнейшей задачей современной возрастной антропологии и профилактической медицины. Вариации телосложения в эпохальном аспекте могут служить маркером глобальных изменений в структуре питания, экономического положения, влияния эпигенетических факторов и уровня здоровья различных популяций [6], данные о величинах тотальных размеров тела и морфотипологических особенностях организма могут также служить критериями социального благополучия общества.

В связи с вышеуказанными проблемами **целью данной работы** было исследование эпохальных изменений морфотипа современного человека на основе сравнительного ретроспективного анализа антропометрических данных московской студенческой молодежи в возрасте 17–18 лет. Этот возрастной контингент является наиболее удобным для изучения секулярного тренда, поскольку юноши и девушки к 17–18-летнему возрасту уже закончили свой скелетный рост и достигли дефинитивных размеров и пропорций тела, а изменения показателей телосложения в связи со старением организма у них еще не начались.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили результаты антропометрического мониторинга, ежегодно проводившегося с 2000 по 2018 гг. в ходе профилактического осмотра абитуриентов, поступивших на первый курс МГУ имени М.В. Ломоносова. Для корректного решения поставленной цели в работе были использованы данные только для 17–18-летних юношей и девушек, родившихся и постоянно проживающих в Москве, у которых оба родителя по национальности русские. Общее число обследованных – 6382 человека, из которых 2970 юношей и 3412 девушек.

Программа антропометрического обследования наряду с длиной и массой тела включала измерения плечевого и тазового диаметров (с помощью большого толстого циркуля GPM, Швейцария); обхватов корпуса и конечностей (полотняной сантиметровой лентой); толщины жировых складок под лопаткой, на животе и на задней поверхности плеча (с использованием калипера GPM); ширины локтя, запястья и колена (скользящим циркулем GPM), а также размеров головы и лица (с помощью малого толстого и скользящего циркулей GPM). Все материалы

обследования собраны с соблюдением правил биоэтики (подписание протоколов информированного согласия на обследование и деперсонализирование индивидуальных данных).

Для анализа эпохальных изменений тотальных размеров тела и секулярной динамики более широкого спектра соматометрических показателей были использованы данные, полученные из литературных источников [11–14] при обследовании в разные годы (начиная с 1920-х гг.) аналогичного по возрасту, национальной принадлежности и месту проживания контингента (юноши и девушки в возрасте 17–18 лет, родившиеся и постоянно проживающие в Москве, русские по национальности). Большинство из использованных для сравнения соматометрических данных получено исследователями московской антропологической школы В.В. Бунака, т.е. измерения тела и головы проведены на основе общей унифицированной антропометрической методики.

Статистическая обработка материалов осуществлялась в пакете программ STATISTICA 10.0 и программе Microsoft Excel из стандартного пакета Microsoft Office 2010 с применением методов одномерной и многомерной статистики. Значимость различий средних арифметических величин устанавливалась с помощью t-критерия Стьюдента; для расчета достоверности векторов секулярного тренда проводился регрессионный анализ. В качестве показателя скорости секулярных изменений использовался коэффициент прямолинейной регрессии (В) который является угловым коэффициентом линии регрессии между годом обследования и морфологическим признаком, зависящим от ее угла по отношению к оси абсцисс.

Результаты

На рис. 1 и 2 представлена эпохальная динамика длины и массы тела у 17–18-летних москвичей.

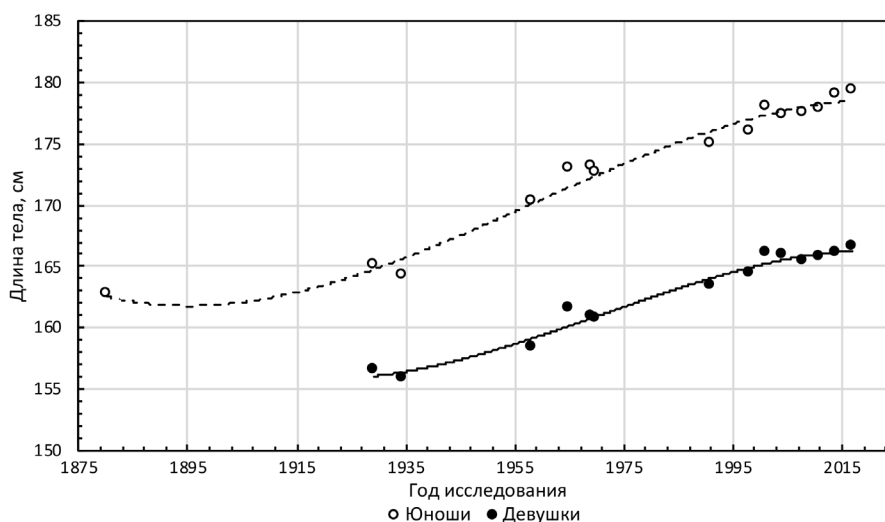


Рис. 1. Эпохальная динамика длины тела у 17–18-летних юношей и девушек г. Москвы. Для построения рисунка использованы материалы 1880 г. [12]; 1928–1930 гг. [12]; 1934–1935 г. [11]; 1958–1965 гг. [12]; 1968–1973 гг. [14]; 1991–1996 гг. [13]; 2000–2018 гг. [авторские данные].

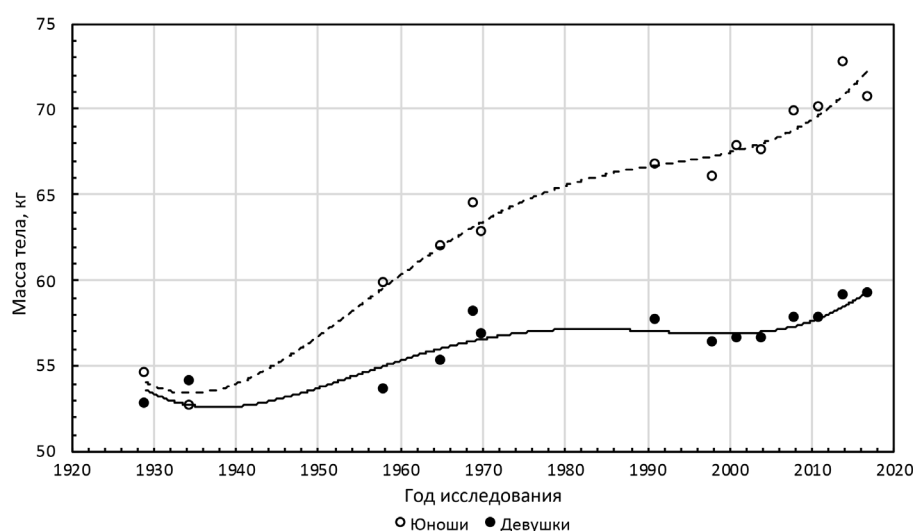


Рис. 2. Эпохальная динамика массы тела у 17–18-летних юношей и девушек г. Москвы. Для построения рисунка использованы материалы 1928–1930 гг. [12]; 1934–1935 г. [11]; 1958–1965 гг. [12]; 1968–1973 гг. [14]; 1991–1996 гг. [13]; 2000–2018 гг. [авторские данные].

ских юношей и девушек. На рис. 1 у обоих полов отчетливо выражена секулярная (межпоколенная) тенденция постепенного увеличения длины тела, продолжающаяся до начала III тысячелетия. Средние значения роста (длины тела) у современных 17–18-летних московских юношей (2016–2018 гг. обследования) – $179,4 \pm 0,5$ см, у девушек – $166,6 \pm 0,4$ см. За последние 70–80 лет (с конца 1920-х гг.) длина тела у юношей увеличилась на 14,4 см, у девушек – на 10,1 см. Результаты регрессионного анализа показали высокую степень достоверности секулярного тренда длины тела (для юношей коэффициент регрессии $B = 0,142$, $p < 0,001$; для девушек $B = 0,126$, $p < 0,001$). Коэффициенты корреляции, определяющие тесноту связи признака со временем, составили 0,978 и 0,982 у юношей и девушек соответственно ($p < 0,001$ для обоих полов).

Для массы тела, начиная с 1930-х гг. до настоящего времени (рис. 2), так же, как и для длины тела, характерна общая тенденция увеличения средних показателей (для юношей $B = 0,198$, $r = 0,974$, $p < 0,001$; для девушек $B = 0,057$, $r = 0,844$, $p < 0,001$). При этом темпы межпоколенного увеличения массы тела у юношей существенно превышают таковые у девушек. Для юношей, начиная с конца 1990-х гг. до настоящего времени, масса тела увеличилась на 4,67 кг, для девушек – за эти же 20 лет – на 2,85 кг.

Поскольку в последние десятилетия усиливается интерес к секулярным изменениям не только тотальных размеров тела (длины и массы тела), но и пропорций телосложения, а также компонентного состава тела, в табл. 1 приведены результаты сравнения морфологических признаков, наиболее информативных в отношении раз-

Таблица 1

Средние значения соматометрических признаков (средняя арифметическая $\pm$ квадратическая ошибка средних) у 17–18-летних юношей и девушек Москвы, обследованных в разные годы

Соматометрические признаки	Юноши		Девушки	
	1968–1973 гг. [14]	2016–2018 гг. [авторские данные]	1968–1973 гг. [14]	2016–2018 гг. [авторские данные]
Длина тела (см)	$172,60 \pm 0,68$	$179,38 \pm 0,47^{***}$	$160,73 \pm 0,72$	$166,62 \pm 0,39^{***}$
Масса тела (кг)	$62,80 \pm 0,69$	$70,63 \pm 0,79^{***}$	$56,83 \pm 0,83$	$59,18 \pm 0,59^*$
Плечевой диаметр (см)	$38,52 \pm 0,19$	$39,17 \pm 0,16^*$	$34,86 \pm 0,16$	$35,50 \pm 0,13^{**}$
Тазовый диаметр (см)	$27,95 \pm 0,15$	$27,50 \pm 0,16$	$27,60 \pm 0,18$	$26,97 \pm 0,15^*$
Обхват груди (см)	$90,01 \pm 0,62$	$89,58 \pm 0,49$	$82,53 \pm 0,50$	$85,08 \pm 0,39^{***}$
Обхват плеча (см)	$27,59 \pm 0,25$	$28,50 \pm 0,23^*$	$26,76 \pm 0,29$	$26,34 \pm 0,20$
Обхват бедра (см)	$52,33 \pm 0,36$	$55,79 \pm 0,42^{***}$	$55,12 \pm 0,51$	$56,44 \pm 0,36^*$
Жировая складка под лопаткой (мм)	$7,59 \pm 0,16$	$11,30 \pm 0,35^{***}$	$10,68 \pm 0,39$	$12,55 \pm 0,37^{**}$
Жировая складка на животе (мм)	$8,18 \pm 0,33$	$14,84 \pm 0,62^{***}$	$14,53 \pm 0,54$	$18,80 \pm 0,50^{***}$
Жировая складка на трицепсе (мм)	$7,66 \pm 0,32$	$11,05 \pm 0,40^{***}$	$15,73 \pm 0,43$	$15,18 \pm 0,40$
Ширина локтя (мм)	$71,13 \pm 0,04$	$69,62 \pm 0,33^{**}$	$61,96 \pm 0,33$	$61,03 \pm 0,27^*$
Ширина запястья (мм)	$59,04 \pm 0,34$	$56,41 \pm 0,29^{***}$	$51,57 \pm 0,29$	$49,73 \pm 0,21^{***}$
Ширина колена (мм)	$99,70 \pm 0,51$	$96,62 \pm 0,46^{***}$	$95,39 \pm 0,71$	$89,98 \pm 0,54^{***}$

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия

вития трех основных соматических компонентов (жирового, мышечного и скелета), для юношей и девушек двух поколений: молодежи 1970-х гг. [14] и современной молодежи, обследованной в 2016–2018 гг.

Как юноши, так и девушки за последние 40 лет стали значительно выше: юноши — на 6,78 см ($p < 0,05$), девушки — на 5,89 см ($p < 0,05$). Для современных юношей также характерно отчетливое увеличение массы тела и средних значений толщины всех жировых складок (табл. 1). Одновременно с этим у юношей наблюдается незначительное снижение массивности скелета (уменьшение ширины дистальных эпифизов конечностей: ширины локтя, запястья и колена). У поколения современных девушек отмечены аналогичные тенденции, только с меньшей степенью выраженности: с увеличением массы тела у девушек стало больше подкожного жира на корпусе (под лопаткой и на животе) и незначительно уменьшились показатели массивности скелета.

В табл. 2 представлены секулярные изменения размеров головы и лица, произошедшие в московской популяции за последние 75 лет. В период от 1940-х гг. до настоящего времени у обоих полов отчетливо прослеживается постепенное увеличение продольного диаметра головы (для юношей коэффициент регрессии $B = 0,122$, $p < 0,01$; для девушек $B = 0,089$, $p < 0,001$) с коэффициентами корреляции, определяющими тесноту связи признака со временем, 0,984 и 0,991 ($p < 0,01$ и $p < 0,001$) у юношей и девушек соответственно. Величина различий за 75 лет (три поколения) достигает 6,77 мм у девушек и 8,99 мм — у юношей, что соответствует 1,13 и 1,36 величины среднего квадратического отклонения для этого признака и сопоставимо с различиями

по длине тела в 6–8 см. Изменения поперечного диаметра головы и нижнечелюстного диаметра у обоих полов статистически недостоверны и не имеют ярко выраженного секулярного вектора. Отчетливая межпоколенная динамика прослеживается в уменьшении значений головного указателя (лучше выраженная у юношей) и увеличении значений лицевого указателя у обоих полов (табл. 2).

Обсуждение результатов

Эпохальное увеличение (за последние 100 лет) длины тела у московской молодежи по данным сравнительного ретроспективного анализа составило более 14 см у юношей и более 10 см у девушек. Такое явление эпохального увеличения длины тела (в большей или меньшей степени выраженности) наблюдалось повсеместно в Европе на протяжении почти всего XX в. [1–5]. В качестве основных причин межпоколенных изменений тотальных размеров тела большинством авторов признается влияние различных факторов среды, из которых ведущая роль принадлежит социально-экономическим условиям жизни [2, 3]. Некоторые авторы считают, что эпохальная тенденция увеличения дефинитивной длины тела определяется в первую очередь улучшением доступа к современной медицине и качественному питанию [5], в качестве дополнительных факторов отмечаются уровень образования родителей, средний душевой доход, социально-экономическое положение.

Увеличение длины тела московской молодежи вполне сопоставимо с цифрами «приростов» для высокоразвитых стран Европы и совпадает с улучшением социально-экономических условий в СССР, наиболее отчетливо наблюдавшимся в 1960–1970-х и начале 1980-х гг. В онлайн-изда-

Таблица 2

Средние значения размеров головы и лица у 17–18-летних юношей и девушек Москвы по результатам разных лет исследования

Период исследования [источник материалов]	Продольный диаметр головы (мм)	Поперечный диаметр головы (мм)	Головной указатель ¹	Нижнечелюстной диаметр (мм)	Лицевой указатель ²
Юноши					
1940 г. [11]	186,5	153,3	82,2	101,7	—
1963–1964 гг. [14]	189,7	155,4	81,9	106,0	87,3
1996–1997 гг. [13]	194,8	155,7	80,0	105,7	91,3
2000–2002 гг. [авторские данные, N = 364]	193,73±0,35	151,00±0,32	78,01±0,21	105,27±0,30	93,29±0,33
2013–2018 гг. [авторские данные, N = 156]	195,49±0,54	152,86±0,44	78,24±0,28	105,54±0,49	—
Девушки					
1940 г. [11]	179,1	148,5	82,9	98,0	—
1963–1964 гг. [14]	181,9	151,1	83,1	100,7	86,8
1996–1997 гг. [13]	184,9	151,2	81,8	100,9	89,0
2000–2002 гг. [авторские данные, N = 359]	184,76±0,34	145,67±0,33	79,09±0,22	100,03±0,31	90,72±0,30
2013–2018 гг. [авторские данные, N = 141]	185,87±0,55	146,85±0,40	79,07±0,31	100,00±0,60	—

Примечание: ¹ Головной указатель = (поперечный диаметр головы / продольный диаметр головы) · 100%.

² Лицевой указатель = (морфологическая высота лица / скуловой диаметр) · 100%.

нии «Elife» [4] эпохальные изменения длины тела в 200 странах мира рассматриваются как результат биосоциальной адаптации к условиям окружающей среды. В последнее время появляется много работ, показывающих, что ведущую роль в секулярных изменениях основных параметров телосложения играют эпигенетические факторы [2, 5], в частности, регуляция экспрессии генов, изменение метаболизма, физиологические, поведенческие факторы и др.

Отдельного внимания заслуживает исследование, проведенное группой ученых [15], по изучению дефинитивной длины тела в современных популяциях из 105 стран мира, результаты которого продемонстрировали неслучайные связи данного показателя с качеством питания, в частности, с количеством и качеством потребляемого белка. Авторы этой работы установили, что в странах, в которых в начале XX в. зафиксировано увеличение потребления животных белков, одновременно наблюдается увеличение средней длины тела у мужчин 18–30 лет. Другими важными факторами, определяющими увеличение дефинитивного роста, являются высокие показатели в стране валового внутреннего продукта, высокие темпы урбанизации, низкая детская смертность, высокие показатели социального развития и, главным образом, увеличение расходов на здравоохранение и снижение коэффициентов рождаемости [15]. Все перечисленные особенности были характерны для развития нашей страны в 60–70-х и начале 80-х гг. прошлого века, что, по всей вероятности, обусловило увеличение длины тела у молодежи московского мегаполиса. С начала 2000-х гг. для обоих полов отмечена относительная стабильность значений этого показателя (см. рис. 1), что также согласуется с литературными данными о замедлении процессов увеличения длины тела в других странах мира [8].

Эпохальная динамика массы тела московских юношей и девушек во многом сходна с изменениями, наблюдающимися для его длины (см. рис. 2), и аналогична секулярным тенденциям, характерным для молодежи других стран мира. Так с 1985 по 2005 гг. в Германии [8], Польше [16] и Корее [17] увеличение массы тела у юношей составило 2,8, 2,1 и 5,1 кг/декаду соответственно. В Иране масса тела юношей с 1990 по 2000 гг. увеличилась на 3,5 кг [18]. В Японии с 1995 по 2005 гг. увеличение составило 1,5 кг [19]. При этом после 2000 г. не происходит замедление темпов увеличения массы тела — например, в Германии [8] и Польше [16] продолжается значительный прирост этого показателя.

Для девушек, согласно ретроспективным литературным данным, наблюдается несколько иная картина. С 1975 по 1995 гг. в Корее [17] и Китае происходит сильное увеличение средней массы тела (со скоростью 2,8 и 3,4 кг/декаду со-

ответственно), но после 1995 г. на обследованных территориях происходит уменьшение темпов прироста этого показателя. Так, в Корее за десятилетие средняя масса тела увеличилась на 1 кг [17], в Китае и Японии [19] на 0,5 и 0,15 кг соответственно. Для девушек из Румынии с 1998 по 2010 гг. показано даже незначительное уменьшение массы тела.

Полученные в нашем исследовании результаты также выявили различия в динамике массы тела у московских юношей и девушек в последние десятилетия. У московских юношей темпы увеличения массы тела (2,2 кг/декаду) превышают таковые у девушек (около 1,3 кг/декаду), а в конце 1990-х — начале 2000-х гг. у девушек наблюдалось даже небольшое уменьшение средних значений этого показателя. Меньшие абсолютные «приросты» средних значений массы тела у девушек по сравнению с юношами и небольшое снижение массы тела у девушек на рубеже веков, возможно, обусловлены усилившимся в конце 1990-х гг. влиянием социокультурных факторов (широкое распространение в СМИ унифицированного канона женской физической привлекательности, культивирование идей о связи успеха и благополучия в жизни с внешним обликом) [20], которые оказывают более сильное влияние на женскую часть населения, и стремлением девушек (особенно в юношеском периоде онтогенеза) к более стройной фигуре согласно стереотипам красоты [13]. В соответствии с этим, многие девушки стараются ограничивать свой вес, из-за чего происходит снижение темпов прироста массы тела, которое прослеживается по результатам нашего ретроспективного анализа.

Особый интерес представляет *изучение эпохальной динамики другой морфологической системы — головы и лица*. До середины прошлого столетия основным направлением изменений для большинства групп была брахикефализация (процесс изменения формы головы в сторону высоких значений головного указателя, дословно — «округление» головы) [21]. В последние несколько десятилетий во многих странах отмечается новый вектор секулярного тренда размеров головы — дебрахикефализация (форма головы становится менее округлой и более вытянутой; рис. 3А) [22–25], что наблюдается и в результатах нашего ретроспективного исследования. Для обоих полов (табл. 2) за последние 75 лет прослеживается отчетливая тенденция к увеличению продольного диаметра головы и уменьшению значений головного указателя. Сравнение величин лицевого указателя за 40 лет (между периодами обследования 1963–1964 гг. и 2000–2002 гг.) выявило небольшое увеличение этого показателя, что свидетельствует о тенденции к лептопропии (форма лица становится относительно узкой; рис. 3Б) у современной молодежи.

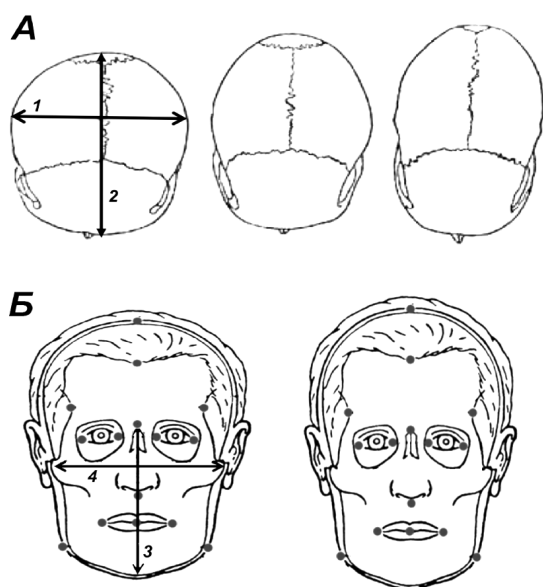


Рис. 3. Изменение формы головы и лица. **А** — тенденция дебрахицефализации: форма головы становится менее округлой и более вытянутой (1 — поперечный диаметр головы, 2 — продольный диаметр головы). **Б** — тенденция лептопрозопии: форма лица становится относительно узкой (3 — морфологическая высота лица, 4 — скуловой диаметр).

Подобные тенденции к дебрахицефализации и лептопрозопии согласуются с общим направлением секулярного тренда, который всегда сопровождается некоторой лептосомизацией (от гр. *leptos* — узкий) телосложения, когда рост длинных размеров опережает рост поперечных размеров. Таким образом, процессы дебрахицефализации и усиление лептопрозопии можно считать неотъемлемой частью общей эпохальной тенденции. Поскольку основной причиной секулярного тренда принято считать комплекс изменений, связанных с улучшением условий жизни, следует признать, что и головной указатель попадает в круг действия этих факторов, несмотря на распространенное мнение, что экзогенные факторы в малой степени определяют изменения головного указателя. Мнение о том, что размеры и форма головы также несут на себе отпечаток воздей-

ствия факторов окружающей среды, высказывал еще в начале XX в. выдающийся американский антрополог Франс Боас [26], однако с течением времени его идеи были забыты. Относительно временной последовательности морфологической трансформации различных систем признаков, можно предположить, что изменения формы головы и лица происходят несколько позже соответствующих изменений формы тела [24].

На основании проведенного ретроспективного исследования можно сделать следующее **закключение**: в течение последних 80 лет (с 1920-х гг. до 2000–2002 гг.) — у 17–18-летних юношей и девушек Москвы наблюдался процесс эпохального увеличения длины тела. Юноши стали более высокорослыми (на 14 см) по сравнению со своими сверстниками, обследованными в конце 1920-х гг., девушки стали выше на 10 см. С начала 2000-х гг. до настоящего времени у обоих полов отмечена относительная стабильность этого показателя. Средние значения длины тела у современной московской молодежи (2016–2018 гг. обследования): $179,4 \pm 0,5$ см — у юношей и $166,6 \pm 0,4$ см — у девушек. У московских юношей в начале XXI в. отмечено продолжение эпохального увеличения массы тела; у московских девушек в конце 1990-х — начале 2000-х гг. наблюдалось небольшое уменьшение средних значений массы тела с последующим незначительным ростом этого показателя. Темпы секулярного увеличения массы тела у юношей существенно превышают таковые у девушек. Наряду с эпохальными изменениями размеров тела для обоих полов отмечена трансформация головы и лица, которая выражается в процессах дебрахицефализации и лептопрозопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18–09–00290).

Исследования проведены с соблюдением этических норм в соответствии с решением Комиссии по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Godina E.Z. Secular trends in some Russian populations // *Anthropol. Anz.* 2011. Vol. 68. N 4. P. 367–377.
2. Bogin B. Secular changes in childhood, adolescent and adult stature // *Recent advances in growth research: nutritional, molecular and endocrine perspectives.* Nestlé Nutr. Inst. Workshop Ser. / Eds. M.V. Gillman, P.D. Gluckman and R.G. Rosenfeld. Basel: Nestec Ltd. Vevey/S. Karger AG., 2013. Vol. 71. P. 115–126.
3. Hermanussen M. Auxology: studying human growth and development. Stuttgart: Schweizerbart, 2013. 324 pp.
4. NCD Risk Factor Collaboration. A century of trends in adult human height // *Elife.* 2016. Vol. 5: e13410.
5. Fudvoye J., Parent A.S. Secular trends in growth // *Ann. Endocrinol. (Paris).* 2017. Vol. 78. N 2. P. 88–91.
6. Hauspie R.C., Vercauteren M., Susanne C. Secular changes in growth and maturation: an update // *Acta Paediatr.* 1997. Vol. 86. N 423. P. 20–27.
7. Malina R.M. Research on secular trends in auxology // *Anthropol. Anz.* 1990. Vol. 48. N 3. P. 209–227.
8. Lehmann A., Floris J., Woitek U., Rühli F.J., Staub K. Temporal trends, regional variation and socio-economic differences in height, BMI and body proportions among German conscripts, 1956–2010 // *Public Health Nutr.* 2017. Vol. 20. N 3. P. 391–403.
9. Koebrick C., Mohan Y.D., Li X., Young D.R. Secular trends of overweight and obesity in young Southern Californians 2008–2013 // *J. Pediatr.* 2015. Vol. 167. N 6. P. 1264–1271.

10. Chimeddamba O., Gearon E., Stevenson C., Li-viya Ng.W., Baasai B., Peeters A. Trends in adult overweight and obesity prevalence in Mongolia, 2005–2013 // *Obesity*. 2016. Vol. 24. N 10. P. 2194–2201.
11. Арон Д.И. Материалы для установления пропорций тела детей и подростков в возрасте от 8 до 18 лет // *Ученые записки МГУ*. 1940. № 34. С. 103–125.
12. Властовский В.Г. Акселерация роста и развития детей. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. 279 с.
13. Година Е.З., Хомякова И.А., Задорожная Л.В., Пурунджан А.Л., Гилярова О.А., Зубарева В.В., Степанова А.В., Фомина А.И. Московские дети: основные тенденции роста и развития на рубеже столетий. Часть I // *Вопр. антропол.* 2003. № 91. С. 42–60.
14. Соловьева В.С., Година Е.З., Миклашевская Н.Н. Материалы продольных исследований московских школьников // *Вопр. антропол.* 1976. № 54. С. 100–118.
15. Grasgruber P., Sebera M., Hrazdírka E., Cacek J., Kalina T. Major correlates of male height: a study of 105 countries // *Econ. Hum. Biol.* 2016. Vol. 21. P. 172–195.
16. Kolodziej H., Lopuszańska M., Lipowicz A., Szklar-ska A., Bielicki T. Secular trends in body height and body mass in 19-year-old polish men based on six national surveys from 1965 to 2010 // *Am. J. Hum. Biol.* 2015. Vol. 27. N 5. P. 704–709.
17. Kim J.Y., Oh I.H., Lee E.Y., Choi K.S., Choe B.K., Yoon T.Y., Lee C.G., Moon J.S., Shin S.H., Choi J.M. Anthropometric changes in children and adolescents from 1965 to 2005 in Korea // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2008. Vol. 136. N 2. P. 230–236.
18. Hosseini M., Taslimi S.H., Dinarvand P., Jones M.E., Mohammad K. Trends in weights, heights, BMI and comparison of their differences in urban and rural areas for Iranian children and adolescents 2–18-year-old between 1990–1991 and 1999 // *Child Care Hlth. Dev.* 2010. Vol. 36. N 6. P. 858–867.
19. Kurokawa N., Nakai K., Suzuki K., Sakurai K., Shimada M., Kameo S., Nakatsuka H., Satoh H. Trends in growth status among schoolchildren in Sendai, Japan, 1994–2003: leveling-off of mean body height and weight // *Tohoku J. Exp. Med.* 2008. Vol. 216. N 4. P. 371–375.
20. Keel P.K., Baxter M.G., Heatherton T.F., Joiner T.E. Jr. A 20-year longitudinal study of body weight, dieting, and eating disorder symptoms // *J. Abnorm. Psychol.* 2007. Vol. 116. N 2. P. 422–432.
21. Schwidetzky I. Descriptive characters of the face in populations comparisons // *Homo*. 1991. Vol. 42. N 3. P. 265–286.
22. Zellner K., Jaeger U., Kromeyer-Hauschild K. Das phänomen der debrachykephalisation bei Jenaer schul-kindern // *Anthropol. Anz.* 1998. Vol. 56. N 4. P. 301–312.
23. Kouchi M. Brachycephalization in Japan has ceased // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2000. Vol. 112. N 3. P. 339–347.
24. Purundjan A., Khomyakova I., Godina E. Secular transformation of head and face sizes in Moscow children and adolescents // *Scripta Periodica*. 2000. N 3. P. 109–114.
25. Buretić-Tomljanović A., Ristić S., Brajenović-Milić B., Ostojić S., Gombac E., Kapović M. Secular change in body height and cephalic index of Croatian medical students (University of Rijeka) // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2004. Vol. 123. N 1 P. 91–96.
26. Boas F. Race, language and culture. N.Y.: The Macmillan company, 1940. 647 pp.

Поступила в редакцию
30.10.2019 г.

После доработки
21.12.2019 г.

Принята в печать
25.12.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SECULAR CHANGES IN MORPHOTYPE OF MODERN HUMAN (BASED ON ANTHROPOMETRIC DATA FROM RETROSPECTIVE SURVEY OF MOSCOW YOUTH)

M.A. Negasheva*, S.N. Zimina, A.A. Khafizova, R.E. Sirazetdinov, I.M. Sineva

*Department of Anthropology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: negasheva@mail.ru

Trends in body size were analyzed based on the results of anthropometric examination of more than 6300 undergraduate students of MSU, obtained in 2000–2018. The retrospective analysis was conducted by comparing data of total body dimensions collected on a sample of young males and females since 1920s. The observations of 17–18-year-old males and females demonstrated increase in height during the last 80 years until the beginning of XXI century in Moscow. This parameter was relatively stable in both sexes since the beginning of 2000s until present. Although the secular increase in body weight in either males or females still continued, some gender differences in growth dynamics of this index were observed. From the microevolutionary prospect highlighted tendencies could be explained as a result of changing lifestyle in modern human populations. Along with secular changes in body size the concomitant changes of head and face dimensions in both sexes were observed, which were probably related to debrachycephalization (decrease in cephalic index) and tendency toward leptoprosopia (increase

in facial index). Investigated patterns of secular (cross—generational) changes in morphological characteristic of modern youth can reflect socio-economic processes occurring in society and could be of great importance for fundamental studies in biology and sociology as well as for preventive medicine.

Keywords: *anthropology, body height and weight, morphotype, secular changes, secular trend, student youth*

Сведения об авторах

Негашева Марина Анатольевна — док. биол. наук, проф. кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: *negasheva@mail.ru*

Зимина Софья Николаевна — канд. биол. наук, инженер-лаборант 1 кат. кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: *sonishat@yandex.ru*

Хафизова Айнура Асхадовна — аспирантка кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: *aya.khafizova@gmail.com*

Сиразетдинов Ринат Эльфатович — аспирант кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: *lomacheg@gmail.com*

Синева Ирина Михайловна — канд. биол. наук, ассистент кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-17; e-mail: *i-sineva@yandex.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.089.67: 576.54

ФОТООТВЕРЖДАЕМЫЕ ПЛЕНКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОИНА И ЖЕЛАТИНА
ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

М.С. Котлярова^{1,*}, А.С. Солдатенко¹, А.Ю. Архипова^{2,3}, И.В. Бессонов⁴,
Л.И. Давыдова⁵, А.М. Мойсенович¹, В.Г. Богущ⁵, В.Г. Дебабов⁵, Штиль А.А.⁶,
М.М. Мойсенович², К.В. Шайтан¹

¹ Кафедра биотехнологии и ² лаборатория конфокальной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Россия, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2;

⁴ АО «ЭФФЕРОН», Россия, 121205, г. Москва, территория Инновационного центра «Сколково», ул. Нобеля, д. 7;

⁵ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1;

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Поиск новых подходов для восстановления кожных покровов — актуальная задача современной регенеративной медицины. Перспективным направлением в данной области является использование биосовместимых материалов. Конструкции из них могут служить основой биомедицинских изделий, предназначенных для замещения поврежденной ткани, или выполнять роль раневых покрытий. В данной работе были созданы фотополимеризуемые пленки на основе фиброина шелка и метакрилированного желатина (Ф-МЖ). В ходе исследования *in vitro* было выявлено, что использование пленок в качестве субстрата для культивирования фибробластов NIH 3T3 и кератиноцитов HaCaT приводит к изменению кинетики роста клеток. По данным МТТ-теста, на фотополимеризуемых пленках скорость пролиферации фибробластов была меньше, а кератиноцитов больше по сравнению с культуральным пластиком. Оценка влияния полученных пленок на регенерацию кожи была произведена *in vivo* в модели полнослойной раны кожи мыши. Использование пленок Ф-МЖ в качестве раневых покрытий способствовало ускорению заживления раны и более полному восстановлению структуры кожи по сравнению с контролем (применение марли). У животных в экспериментальной группе наблюдалось формирование волосяных фолликулов и сокращение площади рубца на 28 сут.

Ключевые слова: раневые покрытия, фиброин, метакрилированный желатин, фотополимеризация, кератиноциты, фибробласты, тканевая инженерия

Одной из ключевых функций кожного покрова является защита внутренней среды организма от агрессивных внешних воздействий. Его повреждения приводят к нарушению этого барьера, что вызывает риск инфицирования, а в ряде случаев, например при тяжелых ожогах, к смертельному исходу. При обширных полнослойных ранах требуется замещение утраченного участка кожи [1]. При этом использование кожных трансплантатов связано с рядом ограничений и риском, в том числе возможностью переноса инфекций в случае аллогенных трансплантатов и необходимостью дополнительных и часто многократных операций по получению кожных пластов — в случае аутологичных. Менее тяжелые повреждения, как правило, могут заживать без хирургического вмешательства. В результате формируются рубцы,

выраженность которых зависит, главным образом, от глубины повреждений. Они могут приводить к нарушению подвижности конечностей, обезображиванию лица и тела [2].

В связи с этим разрабатываются новые подходы к восстановлению повреждений кожи. Применение биосовместимых материалов позволяет создавать раневые покрытия, которые обеспечивают защиту от механических повреждений и проникновения бактерий, а также отводят излишек экссудата при сохранении раневого ложа во влажном состоянии, что благоприятно влияет на процесс заживления [3]. С другой стороны, конструкции на их основе можно использовать для создания эквивалентов кожи, что особенно актуально при значительных повреждениях. В качестве материалов могут быть использованы различные биораз-

лагаемые полимеры синтетического или естественного происхождения [4].

Ранее был получен фотополимеризуемый гидрогель на основе двух биосовместимых природных полимеров: фиброина и метакрилированного желатина [5]. Фиброин – структурный белок шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*, характеризуется высокой биосовместимостью, уникальной прочностью и способностью к биodeградации [6]. Метакрилированный желатин является химическим производным продукта деградации коллагена, а потому, как и коллаген, содержит сайты связывания интегринов, обеспечивающих адгезию клеток [7]. Создание композиционных материалов на основе нескольких биополимеров позволяет сочетать достоинства каждого из компонентов и получить материал с превосходными механическими и биологическими характеристиками и возможностью формирования конструкций с заданными, тонко регулируемыми физическими свойствами и архитектурой [8]. Ранее было показано, что микроносители на основе комбинации фиброина и желатина поддерживают адгезию и пролиферацию клеток *in vitro* [9], а также способствуют ускоренному заживлению полнослойных ран и восстановлению структуры кожи и препятствуют формированию рубца *in vivo* [10]. В данной работе были изготовлены фотополимеризуемые пленки на основе фиброина шелка и метакрилированного желатина, которые могут применяться в качестве раневых покрытий, а также как основа для создания искусственной кожи. Было оценено их взаимодействие с фибробластами и кератиноцитами – основными типами клеток, участвующих в регенерации, – а также влияние свойств материала на процесс восстановления ткани в модели полнослойной раны кожи мыши.

Материалы и методы

Синтез метакрилированного желатина. Навеску кристаллического желатина (160 Bloom, Carl Roth, Германия) растворяли в 0,1М калий-фосфатном буфере (pH 7,2) в круглодонной колбе при перемешивании на магнитной мешалке при 50°C. Итоговая концентрация составляла 5% (w/v). После полного растворения навески добавляли метакриловый ангидрид (Sigma-Aldrich, Германия) из расчета 1 мл на 1 г кристаллического желатина. Реакцию проводили при тех же условиях в течение 1 ч. По ее завершении остужали раствор с взвесью метакрилированного желатина, разбавляли дистиллированной водой в два раза и диализовали против двадцатикратного объема дистиллированной воды при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 сут со сменой каждый час до исчезновения запаха метакрилового ангидрида. Содержимое мешка перемещали в чашки Петри, замораживали в течение 1 ч при –18°C и лиофилизовали в течение ночи.

Получение водного раствора фиброина. Навеску шелковых хирургических нитей растворяли при 80°C в 9,3М растворе LiBr, после чего диализовали против двадцатикратного объема дистиллированной воды в течение суток, при этом производили 10 смен воды во внешнем резервуаре. На спектрофотометре определяли концентрацию фиброина по поглощению при 280 нм и разбавляли раствор дистиллированной водой до 60 мг/мл.

Получение фотополимеризуемой смеси и формирование пленок. Навеску метакрилированного желатина из расчета 60 мг/мл растворяли в ДМСО (Sigma-Aldrich, Германия) при 50°C в термошкафу, после этого добавляли фотоинициатор фенил-бис(2,4,6-триметил-бензоил)фосфин оксид ТРО (Sigma-Aldrich, Германия), концентрация в растворе составляла 3% от массы метакрилированного желатина. Затем добавляли водный раствор фиброина с концентрацией 60 мг/мл. Соотношение фиброина и метакрилированного желатина в конечном растворе составляло 1:1 (w/w). Пленки изготавливали в ламинарном шкафу. Фотополимеризуемую смесь объемом 8 мл наносили на поверхность полированной тефлоновой пластины, формировали квадрат со стороной 8 см и облучали светом ультрафиолетовой лампы в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании полимеризации пластину с пленкой помещали на 10 мин в 96% этанол, затем отделяли пленку и переносили на хранение в 96% этанол.

Сканирующая электронная микроскопия. Для изучения структуры пленки обезвоживали в восходящей концентрации этанола и ацетона, после чего высушивали на приборе Hitachi critical point dryer HCP-2 (Hitachi, Ltd., Япония). Используя прибор Ion Coater IB3 (Eiko Engineering Co, Япония) напыляли слой платины толщиной 20 нм. Образцы изучали на микроскопе Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания), изображения получали в программе MicroCapture (SMA, РФ)

Культивирование фибробластов NIH 3T3 и кератиноцитов HaCaT на поверхности фотоотвержденных пленок. В эксперименте использовали две линии клеток. Фибробласты NIH 3T3 получены из эмбрионов мыши и являются стандартной фибробластоподобной линией для проверки биосовместимости материалов; получены из Российской коллекции клеточных культур. Кератиноциты HaCaT – иммортализованная линия, выделенная из кожи человека; любезно предоставлены Е.Б. Цитриным (ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН», Москва, Россия).

Из пленки круглым ножом вырезали диски диаметром 6 мм, стерилизовали их в 70% этаноле в течение 40 мин и отмывали минимальной средой Игла в модификации Дульбекко (ДМЕМ,

ПанЭко, РФ). Образцы переносили в лунки 96-луночной плашки и наносили по 100 мкл суспензии клеток (около 1,5 тыс фибробластов или кератиноцитов на диск) в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Образцы выдерживали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 7 сут. На 1, 3, 7 сут культивирования проводили МТТ-тест: вносили в лунки по 10 мкл раствора МТТ-реагента (5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 ч. После этого отбирали среду и растворяли образовавшиеся фиолетовые кристаллы формазана в ДМСО. Определяли оптическую плотность раствора при 540 нм. В качестве контроля использовали культуральный пластик.

Модель полнослойной раны кожи мыши. В работе использовали мышей линии C57BL/6N, полученных из питомника «Пушино». Животных анестезировали внутривенной инъекцией 100 мкл смеси 10% анестетика (Zoletil 100, Virbac, Франция) и 20% миорелаксанта (Рометар, Bioveta, Чехия) в стерильном фосфатно-солевом буфере. По достижении полного отсутствия рефлексов на укол задних конечностей приступали к операции. Со спины удаляли шерсть с использованием депиляционного крема, промывали кожу водой и обрабатывали 70%-ным этанолом. Формировали полнослойную асептическую рану стерильным одноразовым ножом для биопсии, диаметр 4 мм (EPITHEASY, Medax, Италия). Раны в экспериментальной группе животных закрывали соответствующего размера дисками, вырезанными из пленки, стерилизованными в 70% этаноле и отмытыми стерильным фосфатно-солевым буфером. В контрольной группе применяли стерильную марлю. Покрытия в обеих группах закрепляли пластырем Tegaderm (3М, США).

Морфометрический анализ скорости затягивания раны и проведение гистологических исследований. Для анализа скорости затягивания раны получали макроизображения ран (на поздних точках рубцов) непосредственно после операции и на 2, 4, 7, 14, 28 сут. Использовали фотокамеру с макрообъективом AF MICRO NIKKOR 200mm 1:4 D. Обрабатывали изображения в программе ImageJ (Национальный институт здоровья, США): выделяли область раны и рассчитывали пиксельную площадь. Ее оценивали в процентах относительно нулевой точки по формуле: (площадь раны на день n/площадь исходной раны) × 100%. Для получения гистологических препаратов на 28 сут животных анестезировали и подготавливали к операции описанным выше способом. Затем вырезали образцы кожи с рубцами размером 1x1 см, расправляли и выдерживали в течение 1 сут в растворе Буена (насыщенный водный раствор пикриновой кислоты, формалин и ледяная уксусная кислота в соотношении 15:5:1 соответственно). Мышей умертвляли путем цервикальной дислока-

ции. По завершении инкубации образцы разрезали по средней линии в области травмы, обезживали в спирте восходящей концентрации, после чего заключали в Histomix (БиоВитрум, РФ). Настраивали прибор для резки таким образом, чтобы получались срезы толщиной 5–7 мкм. Полученные препараты депарафинизировали, проводили их регидратацию, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в бальзам. Препараты исследовали на микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), используя камеру AxioCam MRC 5 (Carl Zeiss, Германия). Рассчитывали количество волосных фолликулов на 1 мм² среза по формуле: количество фолликул по всей площади новообразованной ткани × 1 мм² / площадь новообразованной ткани в мм²

Результаты и обсуждение

В данной работе были получены фотополимеризуемые пленки Ф-МЖ, изображения представлены на рис. 1. Изготовленные структуры характеризовались гибкостью, но были достаточно прочны, чтобы не повреждаться при отделении от тефлона и при различных манипуляциях (рис. 1, А). В гидратированном состоянии полученные пленки представляли собой гибридные гидрогели. Ранее было выявлено, что гидрогели на основе фиброина и метакрилированного желатина имеют пористую внутреннюю структуру [5]. Как показал анализ изображений, полученных методом электронной сканирующей микроскопии (рис. 1, Б), внешняя поверхность исследуемой пленки преимущественно гладкая, без выраженной пористой структуры, с нерегулярно расположенными на ней гранулами. Такие частицы могут быть агрегатами фиброина, образовавшимися при формировании бета-структур после обработки спиртом [11].

Фибробласты и кератиноциты являются клеточными компонентами кожи, активно участвующими в процессах регенерации. Фибробласты синтезируют внеклеточный матрикс и секретируют некоторые факторы роста, необходимые для заживления, а также участвуют в формировании рубцов. Кератиноциты играют ключевую роль в восстановлении эпидермиса после повреждения, что достигается за счет их миграции и пролиферации [12]. Взаимодействие этих двух типов клеток с биосовместимыми материалами в условиях *in vivo* может инициировать процессы регенерации, но требуются предварительные эксперименты *in vitro*.

МТТ-тест позволяет оценить активность дегидрогеназ митохондрий клеток. Величина определяемой оптической плотности формазана линейно зависит от числа живых клеток в исследуемых образцах [13]. Значения этого сигнала для Ф-МЖ и культурального пластика, используемого в качестве контроля, не отличались на 1 сут куль-

тивирования фибробластов NIH 3T3, а на 3 и 7 сут эксперимента отмечено, что использование фотополимеризуемой пленки в качестве субстрата приводит к снижению значений оптической плотности по сравнению с контролем (рис. 1, В). При оценке доли живых и мертвых клеток с использованием оптической микроскопии было выявлено, что показатели жизнеспособности на исследуемом субстрате не отличались от показателей контрольного образца (данные не представлены), из чего был сделан вывод, что такой эффект вызван не токсичностью, а регуляторным воздействием субстрата. Пролиферативная активность фибробластов важна для восстановления кожи, однако ее избыточность является одной из причин фиброза *in vivo* [14].

При культивировании кератиноцитов на Ф-МЖ на 1 и 3 сут эксперимента оптическая плот-

ность формазана не имела статистически значимых отличий от контроля. Ее значения возрастали с течением времени, что свидетельствовало о пролиферации клеток. На 7 сут эксперимента сигнал для образцов пленки был выше по сравнению с культуральным пластиком. Вероятно, компоненты пленки способны оказывать активирующее влияние на пролиферацию кератиноцитов. Ранее показано, что метакрилированный желатин может использоваться для культивирования кератиноцитов и формирования на нем многослойного эпителия [15]. Аналогичные эксперименты проведены и с материалами на основе фиброина [16].

Способность фотополимеризуемых пленок регулировать активность фибробластов и усиливать пролиферацию эпидермальных клеток может способствовать активации процессов репарации и подавлению образования рубца.

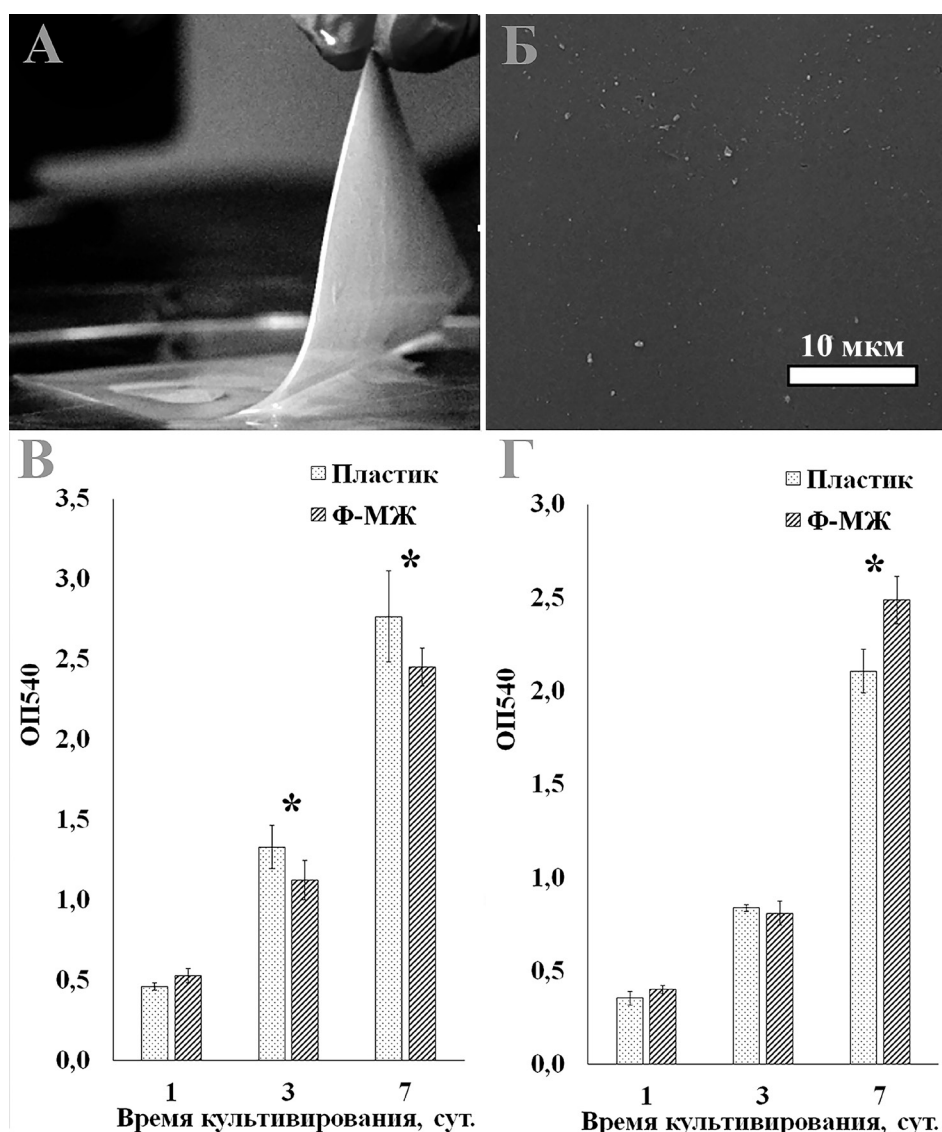


Рис. 1. Фотополимеризуемая пленка на основе фиброина и метакрилизованного желатина (А, Б) и динамика метаболической активности и роста клеток, участвующих в регенерации кожи (В, Г) на пленке и пластике, данные МТТ-теста (* – t-тест Стьюдента, статистически значимые отличия, $p < 0,05\%$). А – внешний вид пленки. Б – структура поверхности пленки, изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии. В – результаты МТТ-теста для фибробластов линии NIH 3T3. Г – результаты МТТ-теста для кератиноцитов линии HaCaT.

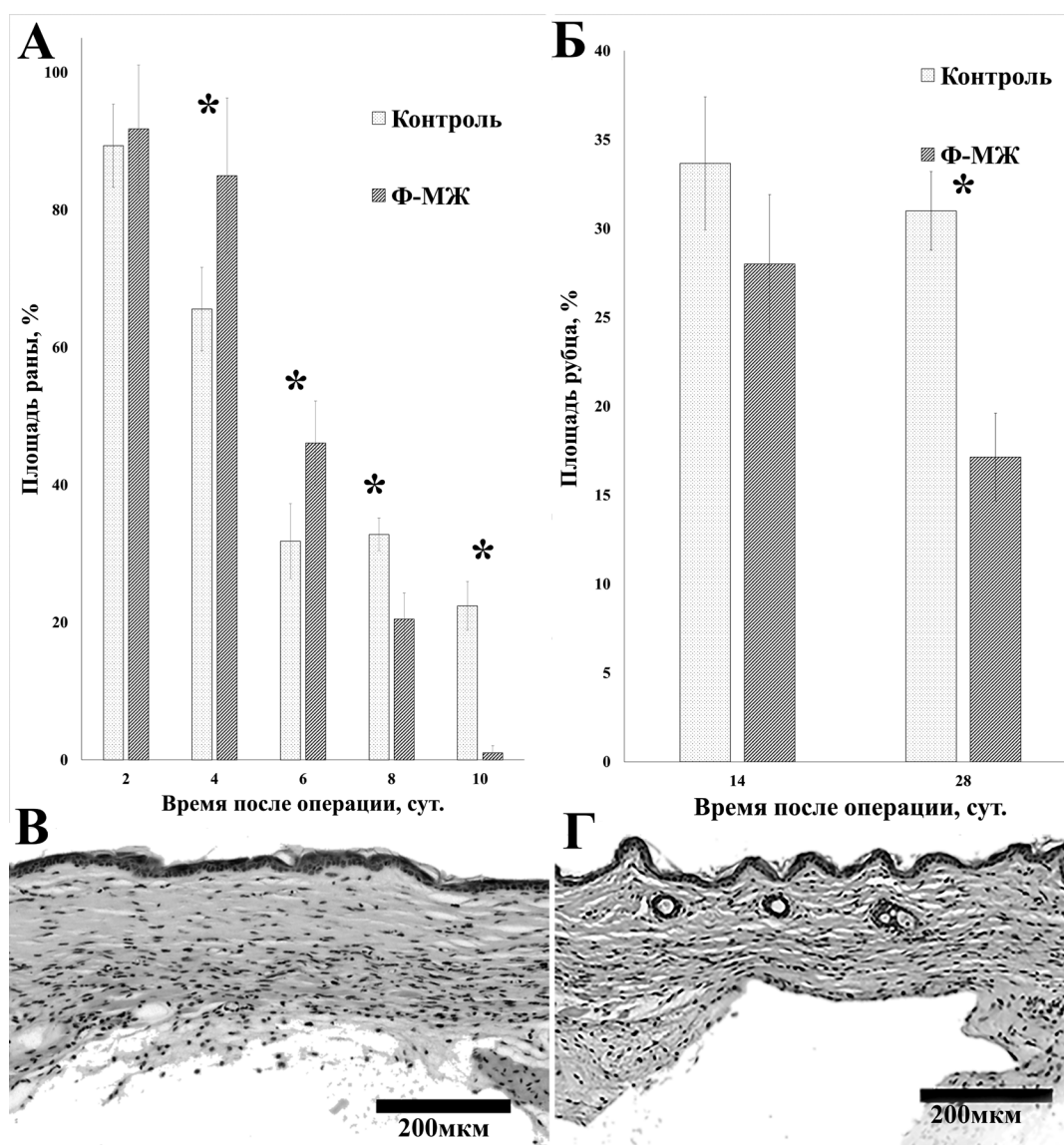


Рис. 2. Морфометрический анализ скорости заживления ран (А) и оценка площади рубца (Б) при использовании пленки из фиброина и метакрилизованного желатина и марли (контроль) в качестве раневых покрытий. (* — t-тест Стьюдента, статистически значимые отличия, $p < 0,05$). Гистологический анализ тканей, сформированных на месте полнослойной раны кожи мыши через 28 сут после повреждения при использовании в качестве раневого покрытия марли (контроль) (В) или фотополимеризуемой пленки (Г).

Влияние фотополимеризуемых пленок на регенерацию оценивали в модели полнослойной раны кожи мыши. В ходе проведенного исследования *in vivo* выявлено, что использование пленок Ф-МЖ для закрытия полнослойных ран снижало их контракцию в первую неделю после операции (рис. 2, А). Вместе с тем дальнейшее затягивание раны происходило быстрее, чем в контрольной группе, где в качестве раневого покрытия использовали марлю, вероятно, за счет ускорения процесса эпителизации. Сходный эффект при заживлении полнослойных ран кожи мышей наблюдался во время исследований коммерческих гидроколлоидных раневых покрытий [17].

При использовании Ф-МЖ формировались менее выраженные рубцы, чем в случае применения марли (рис. 2, Б). Это также подтверждено

данными гистологического анализа. На 28 сут после нанесения повреждений у мышей в контрольной группе была сформирована плотная ткань с характерным для рубца расположением волокон коллагена, а в экспериментальной — сходная с нормальной дермой кожи (рис. 2, В). Эпителий имел большую протяженность, в подлежащей ткани присутствовало значительное количество волосных фолликулов. Их наличие в центре ран, которые закрывали пленками, может указывать на их образование *de novo*. Ранее показано, что этот процесс может протекать при заживлении ран генетически нормальных мышей и на молекулярном уровне имеет сходство с происходящим в ходе эмбриогенеза, а придатки формируются из клеток межфолликулярного эпидермиса [18]. Раневые покрытия могут повышать

эффективность регенерации за счет поддержания оптимальной влажности, что способствует миграции кератиноцитов [19]. Ускоренное восстановление эпидермиса, в свою очередь, является одним из факторов, предотвращающих образование рубцовой ткани [20].

Таким образом, полученные фотополимеризуемые пленки способны активировать пролиферацию кератиноцитов, в то время как их влияние на рост фибробластов противоположно. Исследование *in vivo* продемонстрировало, что использование пленок Ф-МЖ в качестве раневых покрытий способствовало более полному восстановлению тканей в модели полнослойной раны кожи мыши по сравнению с контрольной группой. Заживление раны происходило быстрее в экспериментальной группе, чем в контрольной, и характе-

ризовалось снижением контракции. Кроме того, наблюдалось восстановление придатков кожи в зоне повреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: комплексный проект № 17-00-00359 (научные проекты: № 17-00-00356, № 17-00-00357 и № 17-00-00358) и грант № 18-34-00875 с использованием оборудования, приобретенного в рамках «Программы развития Московского Университета до 2020 года», и оборудования ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stone R., Natesan Sh., Kowalczewski C.J., Mangum L.H., Clay N.E., Clohessy R.M., Carlsson A.H., Tassin D.H., Chan R.K., Rizzo J.A., Christy R.J. Advancements in regenerative strategies through the continuum of burn care // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9. N 1: 672.
2. Varkey M., Visscher D.O., van Zuijlen P.P.M., Atala A., Yoo J.J. Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? // *Burns Trauma.* 2019. Vol. 7. N 1. P. 4–15.
3. Hu Sh., Cai X., Qu X., Yu B., Yan Ch., Yang J., Li F., Zheng Yu., Shi X. Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 123. N 1. P. 1320–1330.
4. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G. et al. 3D-scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)poly(ethylene glycol) copolymer for tissue engineering // *J. Biomater. Tissue Eng.* 2016. Vol. 6. N 1. P. 42–52.
5. Bessonov I.V., Kotliarova M.S., Kopitsyna M.N., Fedulov A.V., Moysenovich A.M., Arkhipova A.Y., Bogush V.G., Bagrov D.V., Ramonova A.A., Mashkov A.E., Shaitan K.V., Moisenovich M.M. Photocurable hydrogels containing spirodion or fibroin // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 1. P. 24–27.
6. Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S.C., Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013 Vol. 65. N 4. P. 457–470.
7. Zhu A., Fang N., Chan-Park M., Chan V. Adhesion contact dynamics of 3T3 fibroblasts on poly (lactide-co-glycolide acid) surface modified by photochemical immobilization of biomacromolecules // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27. N 12. P. 2566–2576.
8. Жаркова И.И., Бонарцев А.П., Босхонджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Зернов А.Л., Андреева Н.В., Иванов Е.А., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках // *Биомедицинская химия.* 2012. Vol. 58. N 5. P. 579–591.
9. Moisenovich M.M., Kulikov D.A., Arkhipova A.Yu., Malyuchenko N.V., Kotlyarova M.S., Goncharenko A.V., Kulikov A.V., Mashkov A.E., Agapov I.I., Paleev F.N., Svistunov A.A., Kirpichnikov M.P. Fundamental bases for the use of silk fibroin-based bioresorbable microvehicles as an example of skin regeneration in therapeutic practice // *Ter. Arkh.* 2015. Vol. 87. N 12. P. 66–72.
10. Arkhipova A.Yu., Nosenko M.A., Malyuchenko N.V., Zvartsev R.V., Moisenovich A.M., Zhdanova A.S., Vasil'eva T.V., Gorshkova E.A., Agapov I.I., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Moisenovich M.M. Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice // *Biochem.* 2016. Vol. 81. N 11. P. 1251–1260.
11. Qi Y., Wang H., Wei K., Yang Y., Zheng R.Y., Kim I.S., Zhang K.Q. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 3. P. 237.
12. ter Horst B., Chouhan G., Moimen N.S., Grover L.M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. Vol. 123. N 1. P. 18–32.
13. Gomez L.A., Alekseev A.E., Aleksandrova L.A., Brady P.A., Terzic A. Use of the MTT assay in adult aentricular cardiomyocytes to assess viability: effects of adenosine and potassium on cellular survival // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997. Vol. 29 N 4. P. 1255–1266.
14. Kuphal S., Bosserhoff A. Recent progress in understanding the pathology // *J. Pathol.* 2009. Vol. 219. N 4. P. 400–409.
15. Zhao X., Lang Q., Yildirimer L., Lin Z.Y., Cui W., Annabi N., Ng K.W., Dokmeci M.R., Ghaemmaghami A.M., Khademhosseini A. Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering // *Adv. Healthc. Mater.* 2016. Vol. 5. N 1. P. 108–118.
16. Min B.-M., Lee G., Kim S.H., Nam Y.S., Lee T.S., Park W.H. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro* // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25. N 7–8. P. 1289–1297.
17. Schunck M., Neumann C., Proksch E. Artificial barrier repair in wounds by semi-occlusive foils reduced wound contraction and enhanced cell migration and reepithelization in mouse skin // *J. Invest. Dermatol.* 2005. Vol. 125. N 5. P. 1063–1071.

18. Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E., Cotsarelis G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding // *Nature*. 2007. Vol. 447. N 7142. P. 316–320.

19. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals // *J. Cell Commun. Signal*. 2016. Vol. 10. N. 2. P. 103–120.

20. Ferguson M.W.J., O’Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic interven-

tion // *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 2004. Vol. 359. N 1445. P. 839–850.

Поступила в редакцию
18.11.2019 г.

После доработки
01.01.2020 г.

Принята в печать
15.01.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

PHOTOCURABLE FILMS BASED ON FIBROIN AND GELATIN FOR REGENERATION OF SKIN COVER

M.S. Kotliarova^{1,*}, A.S. Soldatenko¹, A.Yu. Arkhipova^{2,3}, I.V. Bessonov⁴,
L.I. Davydova⁵, A.M. Moysenovich¹, V.G. Bogush⁵, V.G. Debabov⁵, A.A. Shtil⁶,
M.M. Moisenovich², K.V. Shaitan¹

¹Department of Bioengineering and ²Laboratory of Confocal Microscopy, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Schepkina ul. 61/2, Moscow, 129110, Russia;

⁴JSC “EFFERON”, Nobel ul. 7, Skolkovo territory of the Innovation Center, Moscow, 121205, Russia;

⁵State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center
“Kurchatov Institute”, 1st Dorozhny proezd 1, Moscow, 117545, Russia;

⁶N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoe sh. 23, Moscow, 115478, Russia

*e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

The search for new approaches for skin restoration is an urgent task of modern regenerative medicine. A promising area is the use of biocompatible materials. Designs from them can serve as the basis for biomedical products designed to replace damaged tissue, or serve as wound dressings. In this work, photopolymerized films based on silk fibroin and methacrylated gelatin (F-MG) were created. An *in vitro* study revealed that the use of films as a substrate for the cultivation of NIH 3T3 fibroblasts and HaCaT keratinocytes leads to a change in the kinetics of cell growth. According to the MTT assay, the fibroblasts proliferation rate was lower on photopolymerized films, and keratinocytes’ one was higher compared to culture plastic. An assessment of the effect of the obtained films on skin regeneration was performed *in vivo* in a model of a full-layer wound of mouse skin. The use of F-MG films as wound dressings contributed to the acceleration of wound healing and a more complete restoration of the skin structure compared to control (use of gauze). In animals in the experimental group, the formation of hair follicles and the reduction in the scar area by 28 days were observed.

Keywords: wound dressings, fibroin, methacrylated gelatin, photopolymerization, keratinocytes, fibroblasts, tissue engineering

Сведения об авторах

Котлярова Мария Сергеевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: kotlyarova.ms@gmail.com

Солдатенко Анна Сергеевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: an.soldatenko@yandex.ru

Архипова Анастасия Юрьевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: anastasia-yu-arkhipova@yandex.ru

Бессонов Иван Викторович — директор по науке АО «ЭФФЕРОН». Тел.: 8-499-348-95-58; e-mail: ivanbessonov@gmail.com

Давыдова Любовь Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии Государственного научно-исследовательского института генетики и селек-

ции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: liddvd@mail.ru

Мойсенович Анастасия Михайловна – аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: a-moisenovich@mail.ru

Богущ Владимир Григорьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-04-56; e-mail: vlbogush@mail.ru

Дебабов Владимир Георгиевич – докт. биол. наук, академик РАН, научный руководитель Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел.: 8-495-315-37-47; e-mail: debabov@genetika.ru

Штиль Александр Альбертович – докт. мед. наук, зав. лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Тел.: 8-499-324-24-24; e-mail: shtilaa@yahoo.com

Мойсенович Михаил Михайлович – канд. биол. наук, зав. лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-65; e-mail: mmoisenovich@mail.ru

Шайтан Константин Вольдемарович – докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
РАБОЧЕГО ПРЕДСЕРДНОГО МИОКАРДА КРЫСЫ
ПРИ ЕГО ЛИПОТРАНСФЕКЦИИ
микроРНК miR-1-3p, miR-153-3p И miR-133a-3p**

В.С. Кузьмин^{1,2}, А.Д. Иванова^{1,*}, К.Б. Пустовит^{1,2}, Д.В. Абрамочкин^{1,2}

¹ Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12;

² кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

*e-mail: ashka@yandex.ru

МикроРНК являются малыми одноцепочечными нуклеотидными последовательностями, которые могут регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В настоящее время показано, что некоторые микроРНК играют важную роль в физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы. В данной работе впервые проведено изучение действия липотрансфекции такими микроРНК, как miR-1-3p, miR-153-3p и miR-133a-3p на электрофизиологические параметры миокардиальной ткани. С помощью стандартной микроэлектродной техники регистрировали потенциалы действия (ПД) в тканевых изолированных перфузируемых препаратах предсердия крысы после их обработки трансфицирующей смесью липосомообразующего агента и микроРНК miR-1-3p, miR-153-3p или miR-133a-3p. Показано, что обработка миокардиальной ткани трансфицирующим агентом приводит к пролонгированию фазы реполяризации ПД. Установлено, что микроРНК miR-1-3p и miR-153-3p не оказывает влияния на конфигурацию ПД в течение 6 ч после обработки тканевых препаратов. В то же время, микроРНК miR-133a-3p вызывала статистически значимое увеличение длительности ПД на уровне 90% реполяризации, которое было наибольшим через 4 ч после трансфекции. На основе поиска и анализа возможных мишеней для miR-133a-3p с помощью биоинформационных методов сделано предположение, что эта микроРНК может взаимодействовать с мРНК ряда протеинфосфатаз. Подавление экспрессии протеинфосфатаз в кардиомиоцитах может лежать в основе наблюдаемого увеличения длительности ПД при действии miR-133a-3p за счет влияния на белки кальциевого круговорота.

Ключевые слова: потенциал действия, биоэлектрическая активность, предсердный миокард, трансфекция, микроРНК, сайленсинг, РНК-интерференция

МикроРНК являются малыми одноцепочечными нуклеотидными последовательностями, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне посредством взаимодействия с мРНК белков (так называемой РНК-интерференции или сайленсинга) и, соответственно, влияют на функционирование клеток. Исследования генома человека показали, что существует более 2000 микроРНК, часть из которых является тканеспецифическими. Установлено, что микроРНК являются важными регуляторами целого ряда биологических процессов – например, эмбрионального развития. Показано, что помимо внутриклеточных микроРНК существуют «циркулирующие микроРНК» – молекулы, которые в составе комплексов с транспортными белками или в составе липидных везикул высвобождаются во внеклеточную среду и транспортируются от ткани к ткани кровеносной системой. Отдельные вну-

триклеточные и циркулирующие микроРНК в настоящее время рассматриваются как маркеры заболеваний, в том числе – сердечно-сосудистых [1]. Показано, что микроРНК играют важную роль в физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы [2].

Выявлена связь некоторых микроРНК с формированием ряда патологий сердца [3]. Например, микроРНК участвуют в формировании и определении типа атеросклероза [4, 5]. Показано, что экспрессия miR-133a-3p увеличена в нестабильных атеросклеротических бляшках [6]. Установлено, что микроРНК, являющиеся производными miR-133 могут способствовать предотвращению некоторых форм фибрилляции предсердий, оказывая влияние на электрофизиологические характеристики миокарда [7]. Предполагается, что снижение уровня микроРНК miR-1-3p в кардиомиоцитах предсердий способствует возникновению аритмий, так как

приводит к усилению экспрессии каналов Kir2.1 и, соответственно, калиевого ионного тока IK1 [8]. Чрезмерное повышение уровня miR-1-3p также может способствовать аритмогенезу, но уже за счет влияния на белки кальциевого круговорота в кардиомиоцитах [9]. Кроме того, изменение уровня miR-1-3p в кардиомиоцитах связывают с развитием сердечной недостаточности [10]. Также показано, что при моделировании сердечной недостаточности в ткани сердца существенно увеличивается уровень miR-153-3p [11]. Эта микроРНК регулирует аутофагию и апоптоз кардиомиоцитов при окислительном стрессе, который сопровождает целый ряд сердечных патологий [12].

В настоящее время активно разрабатываются подходы к терапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе микроРНК [13], а также методы доставки микроРНК или их антагонистов в ткани в лабораторных и клинических условиях [14]. Однако крайне слабо исследована способность микроРНК, потенциально взаимодействующих с мРНК белков ионного транспорта, оказывать влияние на функционирование миокарда. В данной работе впервые проведено изучение эффектов трансфекции препаратов миокарда такими микроРНК, как miR-1-3p, miR-153-3p и miR-133a-3p, на их электрофизиологические параметры.

Материалы и методы

Половозрелые самцы крыс стока Wistar (250–300 г, возраст 10 нед.) были получены из питомника «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства. Перед экспериментами животных содержали в виварии в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

Эксперименты проводили с использованием изолированных многоклеточных препаратов правого предсердия (ПП, по одному препарату от 26 животных). Препараты выделяли таким образом, что они состояли из трабекуляризованного участка ПП и его ушка, а также гладкостенной зоны, включающей синоатриальный узел (САУ). Для получения препаратов животных декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердце, промывали его физраствором и отделяли ПП, который затем помещали в перфузионную камеру (3 мл), закрепляли «эндокардиальной» стороной вверх и перфузировали при 37°C раствором Тироде следующего состава (мМ): NaCl–129, KCl–4, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –20,9, MgSO_4 –0,5, NaHCO_3 –20, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ –1,2, глюкоза–5. Раствор насыщали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2), pH раствора составлял 7,4.

В ходе экспериментов регистрировали потенциалы действия (ПД) с помощью стандартной микроэлектродной техники. Для отведения ПД использовали стеклянные микроэлектроды (сопротивление – 15–30 МОм), подключенные к уси-

лителю (Model 1600 Neuroprobe Amplifier, A-M Systems, США). Сигнал от усилителя поступал на АЦП (Е-154, «Л Кард», Россия) и далее на компьютер для записи. Запись и анализ сигналов осуществляли с помощью программы «PowerGraph 3.3» («ДИСофт», Россия) и MiniAnalysis (Synaptosoft, США). При анализе оценивали длительность ПД на уровне 15%, 25%, 50% и 90% реполяризации (ДПД15%, ДПД25%, ДПД50%, ДПД90%). В течение всего эксперимента препараты работали в собственном ритме, определяемом активностью САУ (284 ± 34 ПД/мин, $n=26$).

Эксперименты проводили по следующей схеме: после периода адаптации (30 мин) проводили контрольную запись (5 мин) электрической активности в одной из крупных продольных трабекул в основании ушка правого предсердия. Убедившись, что ПД имеют стабильный потенциал покоя, быстрый фронт и конфигурацию, типичную для рабочего миокарда, осуществляли внутритканевое введение микроРНК. Стеклянную микропипетку, закрепленную в микроманипуляторе и подключенную с помощью катетера (калибр – PE-10) к микроинъектору (PHD ULTRA™ 4400 Syringe Pump Infuse/Withdraw Programmable, Harvard Apparatus, США) вводили в толщу ткани и в течение 10 с вводили 5 мкл трансфицирующей смеси, содержащей микроРНК. Точечные инъекции повторяли 10 раз (всего 50 мкл) таким образом, чтобы площадь обработанного участка предсердного миокарда составляла 2 мм². Трансфицирующая смесь (50 мкл) содержала: липосомоформирующий трансфицирующий агент липофектамин (Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent, Invitrogen, США, 7,5 мкл), одну из 3 микроРНК (Ambion, США, 0,5 мкл микроРНК с концентрацией 50 мкмоль/л) – rno-miR-1-3p (UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUUAU), mo-miR-133a-3p (UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG) или mo-miR-153-3p (UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC), 42 мкл раствора Тироде на основе очищенной от нуклеаз воды (Nuclease-free Water, Ambion, США). Концентрацию микроРНК контролировали с помощью микроспектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, США), формирование липосом контролировали рефрактометрическим методом. Для подтверждения эффективности тканевой трансфекции использовали смесь липофектамина и спирализованного циклического вектора (pEGFP-N1), предназначенного для экспрессии зеленого флуоресцирующего белка (enhanced-GFP) в клетках млекопитающих, содержащего промотор раннего ответа на основе цитомегаловируса человека. Подтверждением эффективности трансфекции служило наличие зеленой флуоресценции с максимумом 510 нм при длине волны возбуждающего света 488 нм спустя 6–12 ч после обработки тканевых препаратов. Флуоресценцию выявляли, используя конфокальный микроскоп

Zeiss LSM700 (Carl Zeiss, Германия). После введения микроРНК электрическую активность регистрировали в области инъекции через 2, 4 и 6 ч. В контрольных экспериментах препараты обрабатывали трансфицирующей смесью аналогичного состава, но не содержащей микроРНК.

Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Статистически значимые различия между группами выявляли с помощью критерия ANOVA (с последующим применением апостериорных тестов для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми измерениями после внесения поправки Даннета и предварительной проверки нормальности распределения в группах с помощью теста Шапиро-Уилка). Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах характеристики ПД, регистрируемых в трабекулярной части правого предсердия при перфузии в течение 6 ч, оставались стабильными либо изменялись незначительно (рис. 1А–Г, рис. 2А). В начале эксперимента ДПД15%, ДПД25%, ДПД50% и ДПД90% составляли $2,8 \pm 0,4$, $5,9 \pm 0,7$, $7,5 \pm 1,6$ и $50,6 \pm 3,2$ мс ($n=5$), соответственно, но через 6 ч увеличивалась на $3,5 \pm 3,4$ ($p = 0,112$), $2,1 \pm 7,1$ ($p = 0,134$), $14,9 \pm 12,9$ ($p = 0,201$) и $21,5 \pm 22,1$ ($p = 0,118$) мс. Тенденцию к увеличению длительности ПД на уровне 90% реполяризации к 6-му часу перфузии можно связать с повышением уровня цитоплазматического кальция $[Ca^{2+}]_i$ в кардиомиоцитах, усилением активности Na^+/Ca^{2+} -обменника (NCX) и увеличением деполяризующей компоненты тока I_{NCX} , способствующей замедлению последней фазы реполяризации ПД у грызунов.

Нами впервые обнаружено, что обработка миокардиальной ткани предсердий крысы трансфицирующей смесью, содержащей липосомообразующий агент, но не содержащей микроРНК, приводит к устойчивому значимому пролонгированию реполяризации, в особенности на уровне ДПД90% (рис. 1А–Г, рис. 2Б). Разовая инъекция трансфицирующей смеси приводит к наибольшему увеличению ДПД90% на 4-й час эксперимента (до $83,4 \pm 13,2$ мс, $n = 5$, $p = 0,015$). Таким образом, липид-содержащие липосомообразующие агенты в миокардиальной ткани способны оказывать существенное влияние на параметры биоэлектрической активности и могут маскировать либо нивелировать эффекты регуляторных соединений. Причины удлинения ПД в предсердном миокарде при действии липосомальных агентов не вполне ясны. Как известно, при трансфекции часть липосом трансфицирующего агента сливается с плазматической мембраной клетки-мишени, при этом чужеродные липиды встраиваются в мембрану. Поэтому наблюдаемый эффект может быть обусловлен неспецифическим влиянием липосомообразующих агентов на физико-химические свойства мембран кардиомиоцитов – например, на их вязкость. Однако влияние на биоэлектрическую активность миокарда именно катионного липосомального агента, такого как липофектамин, может быть связано с его специфическим действием на ионные каналы мембраны. Известно, что для поддержания калиевых каналов входящего выпрямления Kir2.1/Kir2.2/Kir2.3 в открытом состоянии необходимо присутствие в мембране отрицательно заряженных фосфатидилинозитолбисфосфатов (PIP_2), которые взаимодействуют с положительно заряженными аминокислотами молекулы канала. Снижение концентрации PIP_2 в мембране приводит к закрыванию канала. Эти каналы проводят калиевый реполяризующий ионный ток входяще-

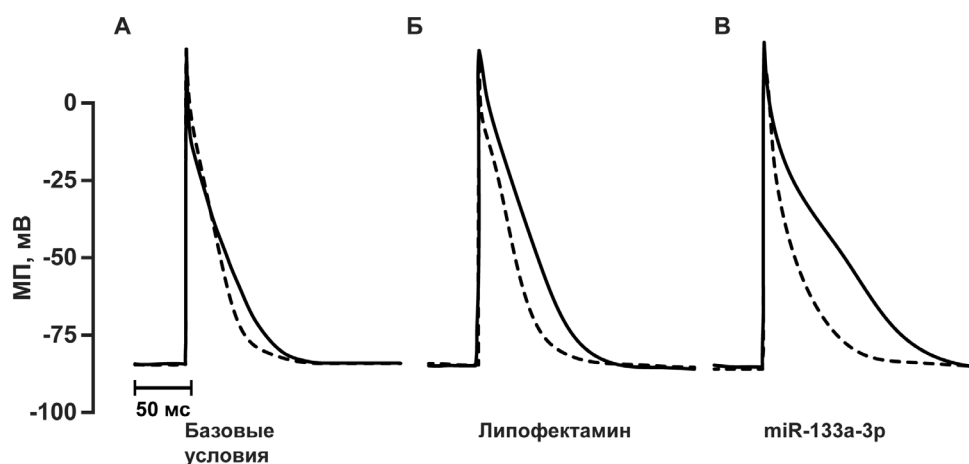


Рис. 1. Изменение конфигурации ПД (в течение 6 ч регистрации) препарата правого предсердия в базальных условиях (А), а также при действии трансфицирующей смеси без микроРНК («липофектамин», Б) и с добавлением miR-133a-3p (В). Пунктирной линией показана конфигурация ПД в базальных условиях, сплошной линией – конфигурация ПД по прошествии 6 ч с момента инъекции тканевых препаратов исследуемыми соединениями.

го выпрямления I_{K1} , который в кардиомиоцитах рабочего миокарда крыс обеспечивает поддержание потенциала покоя, а также участвует в реполяризации. Катионные липиды трансфицирующего агента могут образовывать комплексы с PIP2 в мембранах кардиомиоцитов, уменьшая таким образом их воздействие на $Kir2.x$ и приводя к подавлению реполяризующего тока I_{K1} . Снижение I_{K1} у крыс, в свою очередь, способствует увеличению длительности ПД, особенно в последнюю фазу реполяризации.

В наших экспериментах трансфекция тканевых препаратов ПП микроРНК miR-1-3p ($n = 5$), miR-153-3p ($n = 5$) и miR-133a-3p ($n = 6$) не приводила к большему увеличению ДПД15%, ДПД25% и ДПД50% (рис. 1А–Г), чем в случае их обработки смесью, содержащей только липосомобразующий агент.

В целом ряде работ было показано, что экспрессия каналов входящего выпрямления $Kir2.1$, отвечающих за поддержание потенциала покоя в рабочих кардиомиоцитах, находится под тесным контролем miR-1-3p [3, 15]. Как указано выше, изменение уровня экспрессии $Kir2.1$ сказывается на таком электрофизиологическом параметре, как ДПД90%. Тем не менее, в наших экспериментах мы не обнаружили сколь либо значимого изменения ДПД90% в рабочем миокарде предсердий при его трансфекции miR-1-3p. Спустя 6 ч после трансфекции miR-1-3p ДПД90% составляла $94,4 \pm 4,1$ мс, что не отличается значимо от ДПД90%, наблюдаемой после обработки ткани трансфицирующим агентом без микроРНК ($p = 0,571$). МикроРНК miR-153-3p также не влияла на длительность ПД: ДПД90% на 6-й ч после инъекции составляла $60,9 \pm 9,0$ мс, что не отлича-

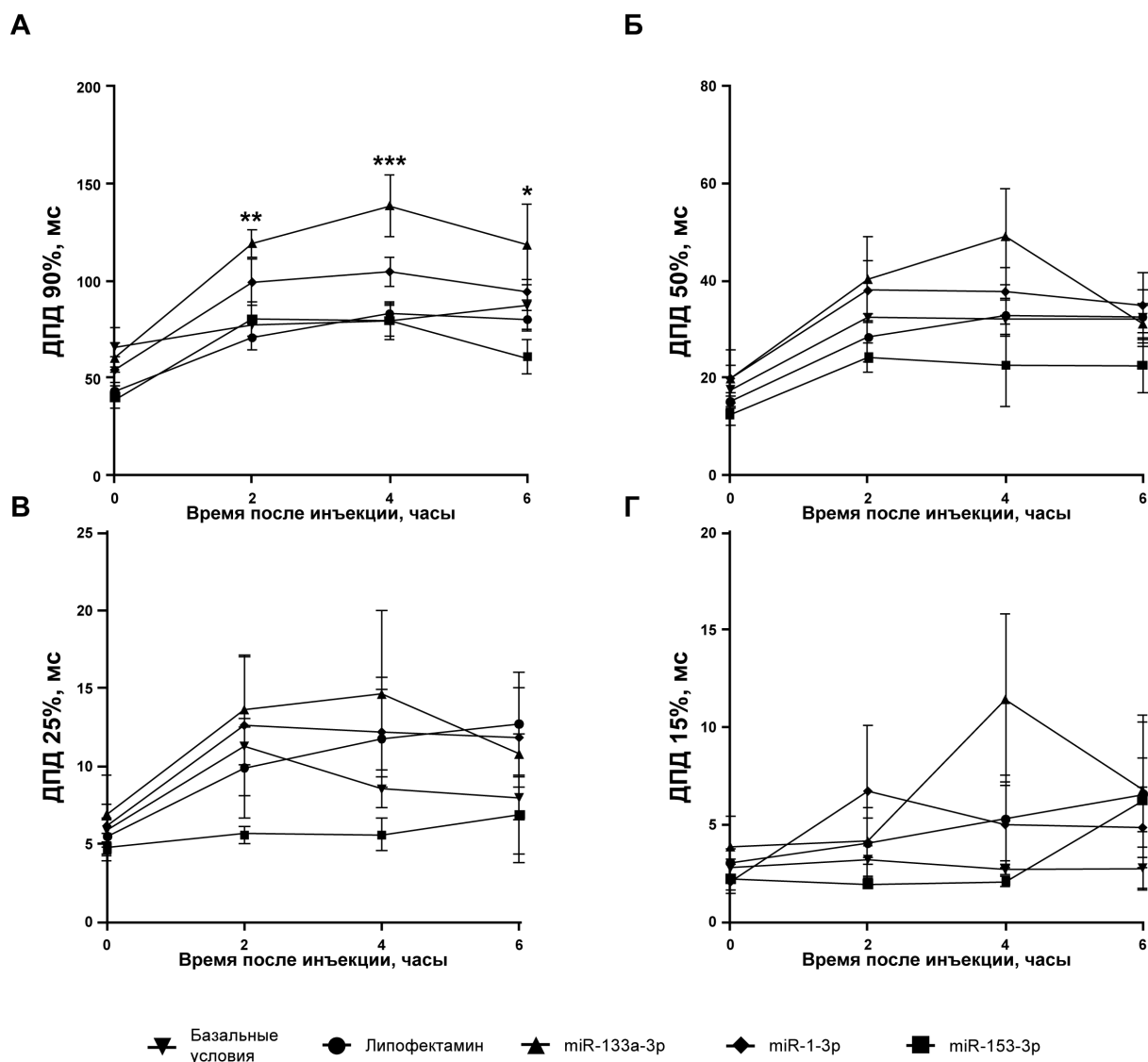


Рис. 2. Длительность ПД на уровне реполяризации 90% (А), 50% (Б), 25% (В) и 15% (Г) в препаратах ПП в базальных условиях (без добавления каких-либо веществ), а также при действии трансфицирующей смеси («липофектамин») без микроРНК и с добавлением микроРНК трех типов – miR-1-3p, miR-133a-3p и miR-153-3p. Нулевая точка соответствует значениям длительности ПД в базальных условиях до инъекции различных веществ. * – $p = 0,025$, ** – $p = 0,003$, *** – $p = 0,001$ – статистически значимое отличие в группе «miR-133-3p» против группы «липофектамин»; двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA.

ется значимо от ДПД90% ($p=0,534$) в контрольной группе (т.е. после обработки только трансфицирующим агентом).

В отличие от предыдущих двух микроРНК, miR-133a-3p оказывала существенное влияние на ДПД90%. В наших экспериментах увеличение ДПД90% начиная с 4-го часа после обработки тканевых препаратов miR-133a-3p было значимо больше ($p=0,001$), чем при обработке только трансфицирующим агентом (рис. 1А, рис. 2А). Через 4 ч после трансфекции miR-133a-3p значение ДПД90% достигало $138,4 \pm 15,9$ мс (рис. 1).

При анализе возможных способов реализации эффектов микроРНК, основанном на поиске их мишеней с помощью аналитической системы DIANA-miRPath (v.3) [16], базы данных KEGG [17], баз данных Targetscan [18] и Tarbase [19] установлено, что высока вероятность взаимодействия miR-133a-3p с мРНК ряда протеинфосфатаз. Посттранскрипционный сайленсинг протеинфосфатаз в кардиомиоцитах может приводить к потенцированию эффектов протеинкиназ, таких как протеинкиназа А, а именно к увеличению выброса кальция из саркоплазматического ретикулума и увеличению уровня $[Ca^{2+}]_i$. Как указано выше, у грызунов повышение уровня

$[Ca^{2+}]_i$ приводит к пролонгированию ПД за счет стимуляции деполяризующей компоненты тока I_{NCX} , чем и может быть объяснен наблюдаемый эффект miR-133a-3p.

Таким образом, липотрансфекция приводит к заметным изменениям биоэлектрической активности миокардиальной ткани; эти изменения могут быть обусловлены эффектами липосомальных агентов в мембране кардиомиоцитов. Несмотря на то, что целому ряду микроРНК уделяется в настоящее время большое внимание как регуляторным молекулам в сердце, в наших экспериментах специфическое влияние на электрофизиологические параметры оказывала только одна из трех протестированных молекул, а именно miR-133a-3p. Несомненно, роль miR-133a-3p как вероятной эндогенной регуляторной молекулы в сердце, а также выявление ее мишеней *in vivo* остаются предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00163).

Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Romaine S.P.R., Tomaszewski M., Condorelli G., Samani N.J. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians // Heart. 2015. Vol. 101. N 12. P. 921–928.
2. D'Souza A., Pearman C.M., Wang Y., et al. Targeting miR-423-5p Reverses exercise training-induced hcn4 channel remodeling and sinus bradycardia // Circ. Res. 2017. Vol. 121. N 9. P. 1058–1068.
3. Yan B., Wang H., Tan Y., Fu W. microRNAs in cardiovascular disease: small molecules but big roles // Curr. Top. Med. Chem. 2019. Vol. 19. N 21. P. 1918–1947.
4. Koroleva I.A., Nazarenko M.S., Kucher A.N. Role of microRNA in development of instability of atherosclerotic plaques // Biochem. 2017. Vol. 82. N 11. P. 1380–1390.
5. Кучер А.Н., Назаренко М.С. Роль микро-РНК при атерогенезе // Кардиол. 2017. Т. 57. № 9. С. 65–76.
6. Baulina N., Osmak G., Kiselev I., Matveeva N., Kukava N., Shakhnovich R., Kulakova O., Favorova O. NGS-identified circulating miR-375 as a potential regulating component of myocardial infarction associated network // J. Mol. Cell. Cardiol. 2018. Vol. 121. P. 173–179.
7. Cheng W.L., Kao Y.H., Chao T.F., Lin Y.K., Chen S.A., Chen Y.J. MicroRNA-133 suppresses ZFHX3-dependent atrial remodelling and arrhythmia // Acta Physiol. 2019. Vol. 227. N 3: e13322.
8. Girmatsion Z., Biliczki P., Bonauer A., Wimmer-Greinecker G., Scherer M., Moritz A., Bukowska A., Goette A., Nattel S., Hohnloser S.H., Ehrlich J.R. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation // Heart Rhythm. 2009. Vol. 6. N 12. P. 1802–1809.
9. Terentyev D., Belevych A. E., Terentyeva R., Martin M.M., Malana G.E., Kuhn D.E. Abdellatif M., Feldman D.S., Elton T.S., Györke S. miR-1 overexpression enhances Ca^{2+} release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56 alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2 // Circ. Res. 2009. Vol. 104. N 4. P. 514–521.
10. Kumarswamy R., Lyon A.R., Volkmann I., Mills A.M., Bretthauer J., Pahuja A., Geers-Knorr C., Kraft T., Hajar R.J., Macleod K.T., Harding S.E., Thum T. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway // Eur. Heart J. 2012. Vol. 33. N 9. P. 1067–1075.
11. Condorelli G., Latronico M.V.G., Dorn G.W. 2nd. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? // Eur. Heart. J. 2010. Vol. 31. N 6. P. 649–658.
12. Zou Y., Liu W., Zhang J., Xiang D. miR-153 regulates apoptosis and autophagy of cardiomyocytes by targeting Mcl-1 // Mol. Med. Rep. 2016. Vol. 14. N 1. P. 1033–1039.
13. Michell D.L., Vickers K.C. HDL and microRNA therapeutics in cardiovascular disease // Pharmacol. Ther. 2016. Vol. 168. P. 43–52.
14. Zhang Y., Wang Z., Gemeinhart R.A. Progress in microRNA delivery // J. Control Release. 2013. Vol. 172. N 3. P. 962–974.
15. Yang B.F., Lin H.X., Xiao J.N., Lu Y., Luo X., Li B., Zhang Y., Xu C., Bai Y., Wang H., Chen G., Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2 // Nat. Med. 2007. Vol. 13. N 4. P. 486–491.
16. Diana Tools mirPath v.3 [Электронный ресурс]. 2019. Дата обновления: 2019. URL: <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/> (дата обращения: 25.10.2019).

17. KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [Электронный ресурс]. 2019. Дата обновления: 2019. URL: <https://www.genome.jp/kegg/> (дата обращения: 25.10.2019).

18. *TargetScan Release 7.2* [Электронный ресурс]. 2018. Дата обновления: 2018. URL: http://www.targetscan.org/vert_72/ (дата обращения: 25.10.2019).

19. *Diana Tools TarBase v.8* [Электронный ресурс]. 2019. Дата обновления: 2019. URL: http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex (дата обращения: 25.10.2019).

[athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex](http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex) (дата обращения: 25.10.2019).

Поступила в редакцию
29.10.2019 г.

После доработки
19.11.2019 г.

Принята в печать
27.01.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

LIPOTRANSFECTION OF MIR-1-3P, MIR-133A-3P AND MIR-153-3P CHANGES THE ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RAT WORKING MYOCARDIUM

V.S. Kuzmin^{1, 2}, A.D. Ivanova^{1, *}, K.B. Pustovit^{1, 2}, D.V. Abramochkin^{1, 2}

¹*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, 117997, Russia*

*e-mail: ashka@yandex.ru

MicroRNAs (miR) are small single-stranded ribonucleotide sequences, which regulate gene expression at the post-transcriptional level. It has been shown that some miRs play a key role in cardiovascular physiology and pathophysiology. In this work the effects of lipotransfection of miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-153-3p on electrophysiological parameters of myocardial tissue were studied for the first time. Action potentials (AP) were recorded in multicellular Tyrode-perfused rat atria preparations after the injection of transfection mixture consisting of lipofectamine and miR-1-3p, miR-133a-3p or miR-153-3p with the usage of microelectrode technique. It was shown that treatment of myocardial tissue with transfection mixture itself leads to a prolongation of AP repolarization phase. Herewith, miR-1-3p, miR-153-3p did not cause a significant change in AP configuration within 6 hrs after the injection in tissue preparations compared to the injection of transfection mixture free of miRs. At the same time, miR-133a-3p caused a significant increase in AP duration at the level of 90% repolarization and the effect was maximal 4 hrs after transfection. Based on the bioinformatic search and analysis of possible miR-133a-3p targets, it was suggested that this miR can interact with the mRNA of a number of protein phosphatases. A suppression of protein phosphatase expression in cardiomyocytes may underlie the observed increase in AP duration under the action of miR-133a-3p due to the affection of proteins involved in calcium dynamics.

Keywords: *action potential, bioelectric activity, atrial myocardium, transfection, microRNA, silencing, RNA interference*

Сведения об авторах

Кузьмин Владислав Стефанович — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ku290381@mail.ru

Иванова Александра Дмитриевна — асп. кафедры физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ashka02@yandex.ru

Пустовит Ксения Борисовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ; науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных, биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.152.34:579.222.3

СЕКРЕЦИЯ МИКРОМИЦЕТАМИ ПРОТЕИНАЗ С АКТИВНОСТЬЮ, ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

А.А. Лукьянова¹, Е.И. Корниенко¹, П.А. Виган², В.Г. Крейер¹,
А.В. Кураков³, А.А. Осмоловский^{1,*}¹ Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² Paris-Saclay University, Route de l'Orme aux Merisiers, RD 128, 91190, Saint-Aubin, France;³ Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

С использованием хромогенных пептидных субстратов изучена протеолитическая активность по отношению к белкам системы гемостаза у 8 микромицетов, относящихся к разным эколого-трофическим группам: фито-, немато-, мико- и энтомопатогенам, а также патогенам человека. Показано, что исследованные микромицеты секретируют протеазы с широкой субстратной специфичностью, однако среди них есть продуценты с выраженной плазминоподобной, урокиназной (*Arthrobotrys longa* 1, *Sarocladium strictum* 203) и подобной тканевому активатору плазминогена активностью (*Purpureocillium lilacinum* k1). Наиболее высокоактивным продуцентом протеаз с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью оказался микромицет *S. strictum* 203. Активаторная к плазминогену активность протеиназ, образуемых *S. strictum* 203, составляет около 50% от фибринолитической, что делает его перспективным продуцентом фибринолитических ферментов.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, плазминоподобная активность, активаторы плазминогена, хромогенные пептидные субстраты

Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов обладают как широкой, так и узкой субстратной специфичностью и способны оказывать всестороннее воздействие на разнообразные белковые субстраты, в том числе на белки системы гемостаза [1–4]. Такие протеазы микромицетов либо напрямую гидролизуют белки-ферменты плазменного гемостаза, либо активируют их проферменты подобно эндогенным факторам свертывания крови (осуществляя реакции ограниченного протеолиза) и могут найти применение в терапии и диагностике тромбозных заболеваний. Исследования последних лет показывают, что проведение широкомасштабного скрининга продуцентов ферментов направленного действия позволяет отобрать микромицеты-продуценты из разных эколого-трофических групп – сапротрофов, фитопатогенов, немато- и энтомопатогенов [3, 5, 6]. Выделенные ферменты разных микромицетов отличаются как по активности, так и по физико-химическим свойствам. Однако направленный поиск высокоактивных продуцентов протеаз и разработка технологии их получения требуют расширения представлений о протеолитическом потенциале микромицетов, выделен-

ных из разных экотопов. Одним из наиболее удобных инструментов в первичном скрининге продуцентов протеаз с активностью белков системы гемостаза служат их хромогенные пептидные субстраты – они позволяют определить спектр активности протеаз микромицетов в отношении ферментов плазмы крови и спрогнозировать активность гидролиза белковых субстратов [4, 7]. Особенно важен такой подход для поиска продуцентов фибринолитических протеаз – как прямого действия на фибрин (плазминоподобная активность), так и опосредованного (активаторная активность к предшественнику фибрина, плазминогену). Наиболее изученными в отношении продукции подобных ферментов являются микромицеты-космополиты, преимущественно относящиеся к сапротрофам – изолятам почв и растительных остатков. В связи с возрастающим интересом к продуцентам протеаз фибринолитического действия, не являющихся сапротрофами, значительный интерес могут представлять представители фито-, немато-, мико- и энтомопатогенов, а также патогенов человека.

Целью работы было изучение активности микромицетов по отношению к белкам системы

гемостаза и отбор активного продуцента фибринолитических протеаз с активаторной к плазминогену активностью среди микромицетов — патогенов разных организмов.

Материалы и методы

Объекты исследования и их поддержание. Использовали штаммы микромицетов *Arthrobotrys longa* 1, *Aspergillus niger* 1, *Beauveria bassiana* 2, *Purpureocillium lilacinum* k1, *Paecilomyces carneus* 1, *Sarocladium strictum* 203, *Tolypocladium cylindrosporum* 31 и *Trichoderma harzianum* 410 из коллекции кафедр микологии и альгологии и микробиологии МГУ. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенной среде Чапека—Докса и сусло-агаре (3°Б). В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

Условия культивирования и определение протеолитической активности. Культивирование микромицетов проводили в глубинных условиях на орбитальной качалке (200 об/мин) в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28 °С в течение 2 сут на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [8, 9], после чего часть полученного посевного материала переносили в среду состава (в %): глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO₃ — 0,2, KН₂РO₄ — 0,05, MgSO₄ — 0,05, рН 5,5 с последующим культивированием в течение 4 сут.

Активность внеклеточных протеиназ определяли в фильтрате культуральной жидкости с хромогенными пептидными и белковыми субстратами.

В качестве хромогенных пептидных субстратов использовали Н-D-Val-Leu-Lys-pNA (S2251) — для определения плазмина, Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S2765) — для определения Ха-фактора плазмы крови человека, Glp-Pro-Arg-pNA (S2366) — для определения активированного протеина C, Glp-Gly-Arg-pNA (S2444) — для определения урокиназы, Н-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S2288) — для определения тканевого активатора плазминогена и Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) — для определения тромбина [10]. Для проведения реакции к 200 мкл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 0,05%-ного раствора (в 0,05М Трис-НСl-буфере, рН 8,2) соответствующего субстрата, полученную смесь инкубировали при 37 °С в течение 5 мин, реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от субстрата за 1 мин.

В качестве белковых субстратов использовали бычий фибриноген и казеин по Хаммерштайну (Sigma-Aldrich, США). Активность определяли с помощью модифицированного метода Ансона—Хагихары, инкубируя при 37 °С 200 мкл культуральной жидкости и 400 мкл 1%-ной суспензии

соответствующих белковых субстратов, приготовленных на 0,1М Трис-НСl-буфере, рН 8,2, как описано ранее [11, 12]. Активность выражали в мкмоль тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{\text{Тир}}$).

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония).

Фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность определяли на прогретых и непрогретых фибриновых пластинах по методу Аструпа—Мюллерца—Лансена [3]. Активность выражали в условных единицах (усл. ед.). За 1 усл. ед. принимали количество фермента, вызывающее зону лизиса фибрина, равную 10 мм².

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорда [13]. Для этого к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Coomassie Brilliant Blue G-250 и регистрировали светопоглощение при 595 нм.

Эксперименты проводили в трех повторностях, ошибка приведенных результатов не превышала 5–7 %. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Использованные в работе штаммы мицелиальных грибов в эколого-трофическом отношении относятся к группам нематофагов (*A. longa* 1), условных патогенов человека (*Asp. niger* 1), фитопатогенов и микопаразитов (*S. strictum* 203, *T. harzianum* 410), энтомопатогенов и микромицетов, ассоциированных с насекомыми (*B. bassiana* 2, *P. carneus* 1, *P. lilacinum* k1, *T. cylindrosporum* 31).

Изучение протеолитической активности микромицетов с хромогенными пептидными субстратами белков системы гемостаза человека проводили на среде, содержащей источники как аминного, так и минерального азота, рост микромицетов на которой можно считать сбалансированным, что позволяет учесть смешанный тип их питания и выявить активность секретируемых ими протеаз [14]. Как показали полученные результаты, большинство культур обладает способностью гидролизовать все использованные субстраты, что может говорить об их широкой субстратной специфичности, однако в большинстве случаев активность была невысокой (от 0,4 до 10 Е/мл $\times 10^{-3}$). Наибольшей активностью с субстратами обладали *A. longa* 1 и *S. strictum* 203, наименьшей — *Asp. niger* 1 (табл. 1).

Микромицет *A. longa* 1 является известным продуцентом протеаз с фибринолитической и ак-

тиваторной к плазминогену активностью — комплекс его протеолитических ферментов известен под названием «Лонголитин» [15]. При росте на ферментационной среде, отличной от использованной ранее, продуцент проявляет характерные для него плазминоподобную активность и активность, подобную активности тканевых активаторов плазминогена (ТАП-подобную активность). Другие типы активности — с субстратами тромбина (тромбиноподобная), урокиназы (урокиназная), активированного протеина С и фактора Ха — были обнаружены впервые.

Как видно из табл. 1, *S. strictum* 203 обладает сходным спектром протеолитической активности, а ее значения в среднем в 1,8 раз превышают активность *A. longa* 1. Внеклеточные протеазы этого микромицета проявляют высокую урокиназную и ТАП-подобную активность, расщепляя субстраты эндогенных активаторов плазминогена человека, что может указывать на их способность к ограниченному протеолизу этого белка системы гемостаза.

Среди остальных микромицетов интерес вызывает *P. lilacinum* k1, протеазы которого обладали выраженной ТАП-подобной активностью и активностью активированного протеина С и не проявляли значительную активность в отношении субстратов тромбина, плазмينا, урокиназы и Ха-фактора.

Активность в отношении использованных субстратов протеаз системы гемостаза микромицетов *B. bassiana* 2, *P. carneus* 1, *T. cylindrosporum* 31 и *T. harzianum* 410 была значительно ниже, хотя хорошо известно, что среди представителей этих видов микромицетов встречаются протеолитически активные представители [16–19].

Дальнейший интерес представляло изучение протеолитической активности в отношении белковых субстратов — фибрина, фибриногена и казеина — малоизученных штаммов — *S. strictum* 203 и *P. lilacinum* k1, которые были отобраны для дальнейших исследований.

Интересно отметить, что все хромогенные пептидные субстраты белков системы гемостаза

расщепляются трипсиновыми протеиназами — соответственно, можно предположить, что и протеазы, секретируемые изученными микромицетами, относятся к этому типу. Однако для мицелиальных грибов вида *P. lilacinum* известно, что образуемые ими протеазы относятся к протеазам субтилизинового типа и не расщепляют хромопептиды-п-нитроанилиды по остатку аргинина [20]. Возможно, выявленная активность этого микромицета принадлежит протеазам другой группы.

В табл. 2 приведены данные по фибринолитической, фибриногенолитической, активаторной к плазминогену и общей протеолитической активности микромицетов *S. strictum* 203 и *P. lilacinum* k1. Было выявлено, что оба микромицета действительно образуют протеиназы, способные активировать плазминоген, что подтверждает данные, полученные с помощью хромогенных пептидных субстратов. Активаторная к плазминогену активность протеаз *S. strictum* 203 была в 2,9 раз выше, чем у протеаз *P. lilacinum* k1, а фибринолитическая — выше в 5,4 раза соответственно. В целом, активность по отношению к фибрину и плазминогену была выше, чем у других микромицетов, у которых она была обнаружена при их росте на использованной ферментационной среде [3]. Следует отметить, что протеазы *S. strictum* 203 были менее активны по отношению к фибриногену и казеину по сравнению с протеазами *P. lilacinum* k1. Так, общая протеолитическая активность *S. strictum* 203 и *P. lilacinum* k1 различалась в 4,3 раза, а фибриногенолитическая — в 16,5 раз. Высокая активаторная к плазминогену и фибринолитическая активность при отсутствии других типов активности, в особенности к глобулярному белку казеину, может указывать на специфичность протеолитических ферментов *S. strictum* 203 и на его преимущество в качестве продуцента фибринолитических ферментов. Количественное определение фибринолитической активности выявило, что протеазы, образуемые *S. strictum* 203 активнее гидролизуют фибрин, нежели фибриноген: значение фибринолитической активности со-

Таблица 1

Протеолитическая активность микромицетов с хромогенными пептидными субстратами протеаз системы гемостаза

Микромицет	Активность с субстратами, Е/мл×10 ⁻³					
	Chromozym TH	S2251	S2444	S2288	S2366	S2765
<i>Aspergillus niger</i> 1	5,1±0,2	3,3±0,2	0,7±0,1	1,8±0,2	0,6±0,2	0,4±0,1
<i>Arthrobotrys longa</i> 1	25,6±0,2	20,1±0,2	20,6±0,2	22,5±0,2	18,2±0,2	18,9±0,2
<i>Beauveria bassiana</i> 2	3,2±0,3	10,2±0,2	2,4±0,2	4,5±0,2	0,7±0,1	2,4±0,2
<i>Purpureocillium lilacinum</i> k1	9,1±0,4	7,3±0,2	2,7±0,2	26,8±0,6	26,2±0,2	7,3±0,2
<i>Paecilomyces carneus</i> 1	2,2±0,1	1,5±0,1	10,8±0,3	1,6±0,2	2,8±0,2	1,5±0,1
<i>Sarocladium strictum</i> 203	40,5±0,6	38,9±0,6	58,3±0,6	39,5±0,6	54,4±0,4	38,2±0,2
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> 31	2,5±0,2	1,5±0,2	3,0±0,2	2,3±0,2	2,8±0,2	3,8±0,2
<i>Trichoderma harzianum</i> 410	0,9±0,1	1,9±0,2	2,7±0,2	0,8±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1

ставило 18,9 Е_{Тир}/мл, фибринолитической активности — 9,3 Е_{Тир}/мл.

Таблица 2

Активность *S. strictum* 203 и *P. lilacinum* k1 с белковыми субстратами

Микромицет	Фибринолитическая активность, усл. ед./мл	Активаторная к плазминогену активность, усл. ед./мл	Фибринолитическая активность, Е _{Тир}	Общая протеолитическая активность, Е _{Тир}
<i>S. strictum</i> 203	485,8±3,5	235,8±3,5	9,3±1,5	32,8±1,5
<i>P. lilacinum</i> k1	166,3±3,5	43,7±3,5	153,0±1,5	139,8±1,5

Как следует из полученных данных, активаторная к плазминогену активность протеиназ, образуемых *S. strictum* 203, составляет около 50% от фибринолитической, как и у протеаз, входящих в комплекс «Лонголитин» [15]. При этом вклад обоих типов активности в суммарное фибринолитическое действие различен: доля активаторной к плазминогену активности в расчете на мг белка составляет лишь одну треть от общего фибринолитического действия протеаз микромицета (рисунок). Однако эффективность гидролиза фибрина протеазами микопаразитического штамма *S. strictum* 203 достаточно высока — соотношение фибринолитической активности и общей протеолитической (соотношение ФА/ОПА [21]) составило 0,57, что значительно превосходит соотношения, установленные для протеаз, образуемых микромицетами-сапротрофами *A. ochraceus* L-1 (0,18), *A. flavipes* A17 (0,27) и *A. terreus* 2 (0,18) [4, 12, 22]. Доля фибринолитической активности протеаз в их общем гидролитическом действии на белки составляет около 40% (рисунок). Полученные данные подтверждают перспективность микромицетов, не являющихся сапротрофами, в качестве продуцентов протеаз, активных по отношению к белкам системы гемостаза.

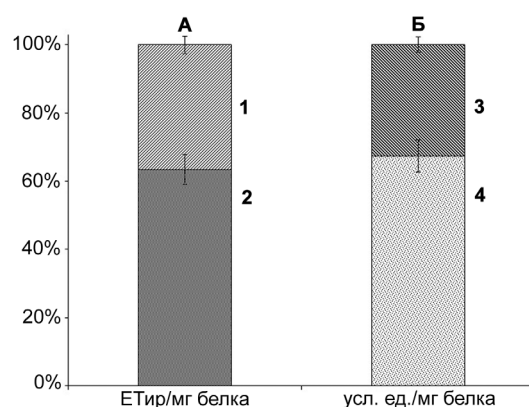


Рисунок. Вклад (в %): А — фибринолитической (1) и общей протеолитической (2) активности; Б — активаторной к плазминогену (3) и фибринолитической (4) активности в суммарное фибринолитическое действие внеклеточных протеиназ *S. strictum* 203.

Таким образом, с использованием хромогенных пептидных субстратов протеаз системы гемостаза изучена активность 9 штаммов микромицетов, относящихся к разным эколого-трофическим группам. Показано, что исследованные микромицеты секретируют протеазы с широкой субстратной специфичностью, однако среди них есть продуценты с выраженной плазминоподобной и урокиназной (*A. longa* 1, *S. strictum* 203) и ТАП-подобной (*P. lilacinum* k1) активностью. Отобран высокоактивный продуцент протеаз с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью — *S. strictum* 203. Активаторная к плазминогену активность протеиназ, образуемых *S. strictum* 203, составляет около 50% от фибринолитической, что делает его перспективным продуцентом фибринолитических ферментов.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // Biotechnol. Prog. 2014. Vol. 30. N 3. P. 656–672.
2. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // Biologia. 2015. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
3. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
4. Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 20–24.
5. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Энтомопатогенные микромицеты — перспективные продуценты протеиназ с фибринолитической активностью // Усп. мед. микол. 2015. Т. 14. С. 458–460.
6. Kim H.C., Choi B.-S., Sapkota K., Kim S., Lee H.J., Yoo J.C., Kim S.-J. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes* // Process Biochem. 2011. Vol. 46. N 8. P. 1545–1553.
7. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular plasmin-like proteases of *Aspergillus ochraceus* micromycete // Applied Biochem. Microbiol. 2017. Vol. 53. N 4. P. 429–434.

8. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // Microbiology. 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.
9. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
10. Proteolytic Enzymes. A practical approach / Ed. R. Beynon and J.S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 pp.
11. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нокардиоформной бактерии *Nocardia minima* в процессе ее роста, развития и дифференциации // Микробиология. 1991. Т. 60. N 4. С. 637–643.
12. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.
14. Blieva R.K., Safuani Zh.E., Iskakbaeva Zh.A. Effect of various sources of nitrogen and carbon on the biosynthesis of proteolytic enzymes in a culture of *Aspergillus awamori* 21/96 // Applied Biochem. Microbiol. 2003. Vol. 39. N 2. P. 188–191.
15. Sharkova T.S., Kornienko E.I., Osmolovskii A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Morphological and physiological properties of the micromycete *Arthrobotrys longa*, a producer of Longolytin, a proteolytic complex with a thrombolytic effect // Microbiology. 2016. Vol. 85. N 2. P. 180–184.
16. Dias B.A., Neves P.M.O.J., Furlaneto-Maia L., Furlaneto M.C. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle // Braz. J. Microbiol. 2008. Vol. 39. N 2. P. 301–306.
17. Umetsu H., Hishinuma K., Wake H., Ichishima E. Production, purification, and properties of serine carboxypeptidase from *Paecilomyces carneus* // Curr. Microbiol. 1996. Vol. 33. N 1. P. 44–48.
18. Scorsetti A.C., Eliades L.A., Stenglein S.A., Cabello M.N., Pelizza S.A., Saparrat M.C. Pathogenic and enzyme activities of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporium* (Ascomycota: Hypocreales) from Tierra del Fuego, Argentina // Rev. Biol. Trop. 2012. Vol. 60. N 2. P. 833–841.
19. Elad Y., Kapat A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea* // Europ. J. Plant Pathol. 1999. Vol. 105. N 2. P. 177–183.
20. Kotlova E.K., Ivanova N.M., Yusupova M.P., Voyushina T.L., Ivanushkina N.E., Chestukhina G.G. Thiol-dependent serine proteinase from *Paecilomyces lilacinus*: Purification and catalytic properties // Biochemistry (Mosc.). 2007. Vol. 72. N 1. P. 117–123.
21. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
22. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Secretion of proteinases with fibrinolytic activity by micromycetes of the genus *Aspergillus* // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 1. P. 39–42.

Поступила в редакцию
06.12.2019 г.
После доработки
07.01.2020 г.
Принята в печать
05.02.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

SECRETION OF PROTEINASE WITH ACTIVITY THAT IS SIMILAR TO ACTIVITY OF PROTEINS OF THE HEMOSTATIC SYSTEM BY MICROMYCETES

A.A. Lukianova¹, E.I. Kornienko¹, P.A. Vigand², V.G. Kreyer¹, A.V. Kurakov³,
A.A. Osmolovskiy^{1,*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Paris-Saclay University, Route de l'Orme aux Merisiers, RD 128, 91190, Saint-Aubin, France;

³ Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

Using the chromogenic peptide substrates, proteolytic activity against proteins of the hemostasis system was studied in 9 micromycetes belonging to different ecological-trophic groups: phyto-, nemato-, myco- and entomopathogens, as well as human pathogens. It is shown that the investigated micromycetes secrete proteases with broad substrate specificity, but among them there are producers with pronounced both plasmin-like and urokinase (*Arthrobotrys longa* 1, *Sarocladium strictum* 203) also as TAP-like (*Purpureocillium*

lilacinum k1) activity. The most active producer of proteases with fibrinolytic and activator activity to plasminogen activity was *S. strictum* 203 micromycete. The activity of proteinases formed by *S. strictum* 203 is about 50% of the fibrinolytic activity of plasminogen, which makes it a promising producer of fibrinolytic enzymes.

Keywords: *micromycete proteinases, fibrinolytic enzymes, thrombolytic agents, plasmin-like activity, plasminogen activators, chromogenic peptide substrates*

Сведения об авторах

Лукьянова Анна Александровна — аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: *a.al.lukianova@gmail.com*

Корниенко Елена Игоревна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: *aljnka-93@mail.ru*

Виган Полин Анастасья (*Pauline Vigand*) — магистр университета Париж-Сакле. Тел.: +33 1 69 33 21 66; e-mail: *pauline-vigand@hotmail.fr*

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: *vkreyer@yandex.ru*

Кураков Александр Васильевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: *kurakov57@mail.ru*

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: *aosmol@mail.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 575.8:582.724.1

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЖМИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ
ДЛЯ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ
(*HIPPOPHAË RHAMNOIDES* L.) РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****К.Д. Боне^{1,2}, Ю.В. Бочаркина³, Г.И. Карлов¹, О.В. Разумова^{3,*}**¹Лаборатория генной инженерии растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42;²Кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства, факультет агрономии и биотехнологии, РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия, 127550, г. Москва, ул. Лиственничная аллея, д. 3;³Лаборатория прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская д. 42

*e-mail: razumovao@gmail.com

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) – двудомный кустарник или дерево. Это многолетнее растение, ювенильный период которого продолжается от 3 до 5 лет. Облепиха широко используется в косметологии, биотехнологии, фармакологии, сельском хозяйстве; она распространена во многих странах Европы и Азии. Это источник ценных витаминов, минералов, каротиноидов и флавоноидов. Фенотипическое описание не дает точную характеристику таксона, в т.ч. вида, подвида, разновидности, популяции, поэтому возникает необходимость использовать молекулярные методы анализа. Для исследования была собрана коллекция облепихи различного эколого-географического происхождения, состоящая из гербарных образцов и образцов, собранных авторами из природных популяций; подобраны межмикросателлитные маркеры, наиболее эффективно выявляющие генотипические различия; составлены бинарные матрицы, на основании которых построена дендрограмма. В результате анализа был выявлен высокий уровень внутривидового полиморфизма, а также установлено, что образцы со сходным эколого-географическим происхождением имеют тенденцию объединяться в кластеры и находятся на разном генетическом расстоянии. Результаты исследования помогут оценить разнообразие форм данной культуры, степень родства между ними, их эколого-географическое происхождение, эволюцию определенных (низших) таксонов, а также произвести паспортизацию и идентификацию сортов до достижения ими генеративного периода, подбирать пары для скрещивания.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, ISSR-маркеры, ПЦР, полиморфизм ДНК, филогенетика, популяционная генетика, дендрограмма

Анализ генетической структуры таксона является очень важным инструментарием популяционной генетики и сельскохозяйственной биологии, поскольку позволяет изучить биоразнообразие культуры, а также установить ее эколого-географическое происхождение, что поможет подбирать пары для скрещивания и устанавливать принадлежность к определенным разновидностям, сортам, экотипам [1].

Семейство Elaeagnaceae включает в себя 3 рода: *Elaeagnus*, *Hippophaë* и *Shepherdia*, представители которых, как правило, являются двудомными [2]. Род *Hippophaë* включает, по разным данным, от 3 до 7 видов. Некоторые ученые выделяют подвиды и экотипы [3]. Таким образом, общепринятого определения подвидов и низших таксонов

облепихи до сих пор нет. Одним из представителей семейства *Hippophaë* является облепиха крушиновидная (*H. rhamnoides* L.) – это колючий кустарник или дерево, плоды которого являются важным источником минералов и масел, богаты углеводами, белками (альбуминами и глобулинами), органическими кислотами, витаминами [4, 5], содержат каротиноиды, а листья – дубильные вещества. Таким образом, облепиха – ценное сельскохозяйственное и лекарственное растение, различные части которого могут быть полезны. Так, в производстве используют семена, ягоды, листья и кору. Из семян получают масло, листья и кору применяют в косметологии и фармацевтике, ягоды – в приготовлении сока и изотонических напитков, эфирные масла используют в медицине, а остав-

шиеся после переработки отходы используют в качестве поливитаминного корма для животных.

Облепиха широко распространена в России, странах Европы и Азии. Она может адаптироваться к различным условиям: произрастать в климатических поясах от тропического до субарктического (выдерживать температуры от -43°C до $+40^{\circ}\text{C}$), выдерживать избыток и недостаток влаги, способна расти на засоленных, щелочных и кислых почвах [6, 7], благодаря чему может быть использована для рекультивирования карьеров, борьбы с почвенной эрозией и посадки лесозащитных полос [6]. Это свидетельствует о ее широких адаптивных способностях, богатом генофонде, а также делает ее полезной в сельскохозяйственной деятельности [8]. Несмотря на то, что облепиха — ценное сельскохозяйственное растение, в культуру она введена сравнительно недавно (в 30-х гг. прошлого века) и, возможно, поэтому мало изучена.

Так как далеко не все изменения в геноме проявляются фенотипически, для изучения эволюции и степени полиморфности определенного вида, входящих в него подвидов, разновидностей и популяций целесообразно использовать молекулярные методы анализа генетического разнообразия: амплификация случайных подобранных нуклеотидных последовательностей — RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов — RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphism), полиморфизм длин амплифицированных рестрикционных фрагментов ДНК — AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), полиморфизм длин межмикросателлитных последовательностей — ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), полиморфизм длин микросателлитных последовательностей — SSR (Simple Sequence Repeats).

Использование ISSR-маркеров не требует предварительного знания нуклеотидных последовательностей геномов [9–11], а также, ввиду высокого содержания микросателлитных повторов в геномах растений, данный тип маркера подходит для анализа генетического разнообразия. ISSR-маркирование предполагает использование более длинных праймеров по сравнению с RAPD, вследствие чего температура отжига увеличивается [10, 12] и обнаруживается большее количество полиморфных локусов [8]. Таким образом, этот метод дает возможность исследовать происхождение различных видов и их эволюцию, а также проводить паспортизацию сортов.

В связи с этим, необходимо было собрать коллекцию облепихи различного эколого-географического происхождения, подобрать подходящие молекулярные маркеры, провести полимеразную цепную реакцию (ПЦР), на основе данных электрофореза о наличии или отсутствии ампликона определенного размера построить би-

нарные матрицы, построить филогенетическое древо.

Материалы и методы

Коллекция, имеющаяся у нас в наличии, состоит из образцов (*Hippophaë rhamnoides*) различного эколого-географического происхождения, собранных в Российской Федерации (Костромская область, Ивановская область, Волгоградская область, Карачаево-Черкессия, Ставропольский край, Москва, Московская область, Краснодарский край, Красноярский край, Новосибирская область, Иркутская область), Румынии, Польше, Австрии, Германии, Бельгии и Нидерландах, а также 11 сортообразцов (рис. 1).

ДНК выделяли из листьев (свежих или сухих) и почек СТАВ-методом (цетилтриметиламмоний бромид) [13]. Наличие ДНК и ее чистоту проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и электрофореза.

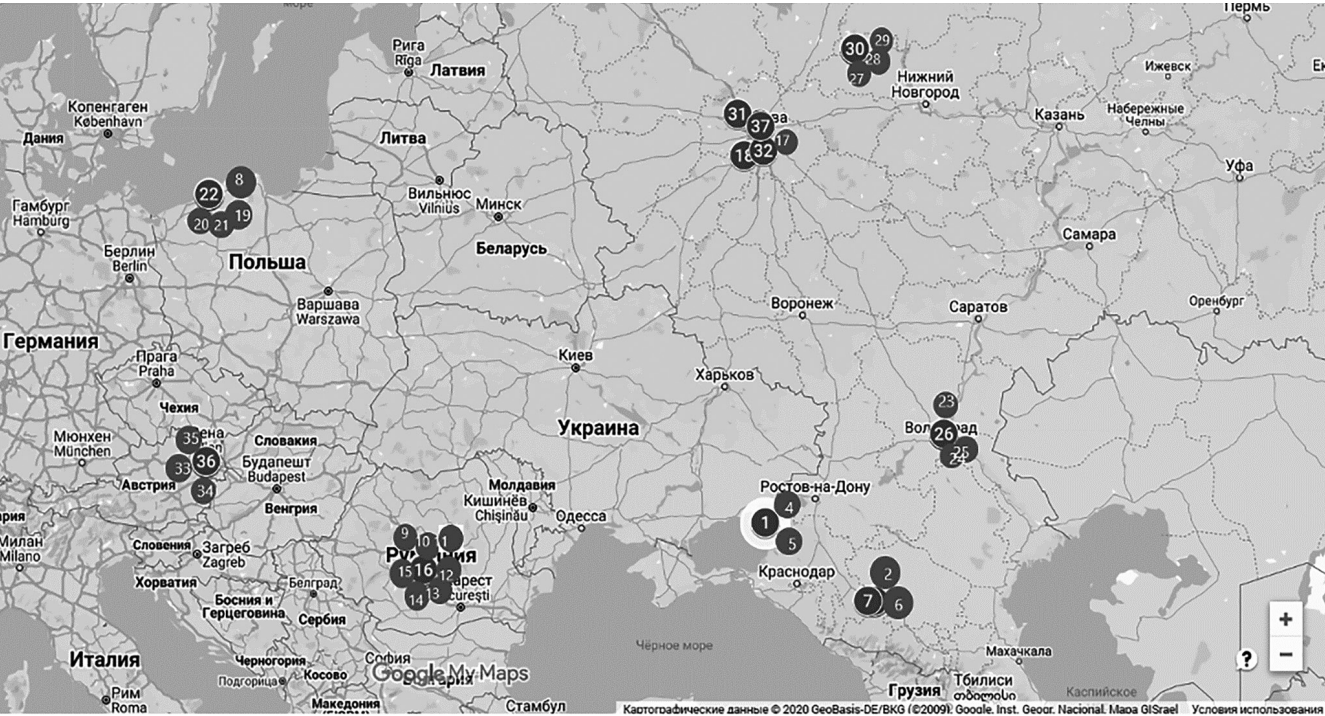
Для молекулярного анализа полиморфизма были отобраны следующие праймеры: K 25, ISSR 3, ISSR 10, UBC 807, UBC 810, UBC 826, UBC 840. Для каждого опытным путем подбирали оптимальную температуру отжига праймера (таблица).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл состояла из 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера, 3,5 мкл 25 mM MgCl_2 , 2,5 мкл 2 mM dNTP — водного раствора четырех высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0,5 мкл 2,5 ед./мкл ColoredTaq-полимеразы (Силекс, Россия); 0,5 мкл праймера; 100 нг ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, США) по следующей программе: предварительная денатурация — 94°C , 5 мин; далее 44 цикла: денатурация — 94°C , 1 мин, отжиг праймеров (температуру отжига устанавливали в зависимости от последовательности праймера — таблица) — 1 мин, элонгация — 72°C , 2 мин; затем один цикл окончательной элонгации — 72°C , 5 мин. Для достоверности полученных результатов опыты проводили в трехкратной повторности.

Амплификат разделяли при помощи электрофореза в горизонтальной камере Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США), в 2%-ном агарозном геле, 0,5 кратном буфере TBE (0,089 M Трис, 0,089 борная кислота, 0,002 M ЭДТА) с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, при напряжении 180 В, в течение 3 ч.

При анализе электрофореграмм были составлены бинарные матрицы, в которых наличие определенной длины амплифицированного фрагмента ДНК отмечали цифрой 1, отсутствие — цифрой 0.

Анализ матриц проводили в программе Past 3.20 (Музей естественной истории, Университет Осло, Финляндия), филогенетическое древо строили на основе алгоритма UPGMA.



Координаты

- 1

46.656674, 37.769940
- 2

44.613958, 41.973525
- 3

44.587198, 41.930796
- 4

46.659142, 37.769415
- 5

46.658669, 37.769548
- 6

44.587198, 41.930796
- 7

44.590612, 41.670778
- 8

54.409946, 16.393850
- 9

45.453308, 24.625256
- 10

45.454471, 24.633055
- 11

45.453326, 24.630819
- 12

45.450139, 24.625662
- 13

45.447791, 24.626255
- 14

45.443715, 24.626936
- 15

45.443553, 24.626854
- 16

45.442838, 24.625405
- 17

55.874227, 37.550507
- 18

55.241341, 36.930473
- 19

54.401595, 16.419596
- 20

54.393613, 16.400442
- 21

54.393629, 16.400256
- 22

54.393434, 16.400482
- 23

48.855611, 44.621333
- 24

48.855361, 44.621667
- 25

48.855139, 44.621944
- 26

48.855139, 44.622278
- 27

57.422622, 41.191225
- 28

57.422967, 41.191104
- 29

57.422523, 41.191227
- 30

57.422643, 41.191148
- 31

56.0853165, 36.7020585
- 32

55.3249354, 37.6738509
- 33

48.181389, 16.304754
- 34

48.180372, 16.304794
- 35

48.181546, 16.304133
- 36

48.181703, 16.304341
- 37

55.84426, 37.58993

Рис. 1. Точки сбора образцов облепихи различного эколого-географического происхождения

Таблица

Праймеры, использованные для ISSR-анализа

Праймеры	Последовательность праймера*	Температура отжига, °C	Количество локусов	Число полиморфных фрагментов	Отношение числа полиморфных локусов к общему числу локусов, %
UBC810	5'GAGAGAGAGAGA GAGAT	52,4	22	22	100
UBC840	5'GAG AGAGAGAGA GAGAYT	53	18	17	94,4
UBC807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT	53	31	14	45,1
UBC826	5'ACACACACACACACC	53,4	30	20	66
K25	5'AGAGAGAGAGAGAGAGG	52	23	17	73,9
ISSR 10	5'AGAGAGAGAGAGAGAGAGG	52,4	21	13	61,9
ISSR3	5'CTCTCTCTCTCTCTCTCTA	54	23	16	69,5

* Y = C or T, R = A or G

Результаты и обсуждение

Различными учеными был проведен ряд исследований по изучению полиморфизма между популяциями *Hippophaë rhamnoides* L. Например, в статье Даса и др. [2] были проанализированы филогенетические отношения между 18 популяциями, содержащими в сумме 92 образца. Все 18 популяций локализованы в северной части Индии, в гористой местности (максимальная разница высот составляет 400 м). Дерево неультраметрическое и неукорененное, построено методом NJ (Neighbour Joining — метод присоединения соседей) с использованием Bootstrap-теста, поддержка которого является низкой, о чем упоминают сами авторы. Коэффициент сходства между популяциями варьируется от 0,63 до 0,93. Из каждой популяции было выбрано по 2 образца: женский и мужской. Таким образом, по данным этой статьи не представляется возможным оценить полиморфизм внутри каждой популяции. Ученые указывают, что нашли различия между мужскими и женскими растениями, однако на дендрограмме это не отражается: образцы объединяются в кластеры независимо от пола.

В статье Тиана и др. [8] коллекция насчитывала более 200 образцов из двух китайских провинций, ученые не обнаружили высокого уровня генетической гетерогенности между популяциями, но утверждают, что уровень полиморфизма внутри популяций был высок и составлял от 0,1558 до 0,2135 по коэффициенту Нея. Коэффициент генной дифференциации (G_{ST}) среди 11 популяций

составил 0,0679. Это указывает на то, что 6,79% общего генетического разнообразия существовало между популяциями, в то время как 93,21% существовали внутри популяций.

В статье Ли и др. [6] была представлена достаточно широкая выборка — 200 образцов из Китая, России, Финляндии и Германии, часть из которых выращивалась в месте происхождения, а часть — в Китае, происхождение остальной части семян неизвестно. Коэффициент сходства Соренсена-Дайса варьируется от 0,23 до 0,93. Укорененная по среднему значению дендрограмма была построена методом NJ на основе результатов амплификации ISSR-праймеров. Большинство популяций объединялось в кластеры согласно происхождению. Образовалось 2 основных кластера и 1 изолированный (состоящий из родственного вида *Hippophae salicifolia* L.).

После изучения справочного материала было принято решение об использовании маркеров ISSR (межмикросателлитных). Было проанализировано 37 таких маркеров, 7 были отобраны для анализа полиморфизма *H. rhamnoides*. На основании полученных данных была построена бинарная матрица, затем с помощью алгоритма UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages, невзвешенного попарно-группового метода расстояний) построена дендрограмма.

ПЦР проводилась в трехкратной повторности, результаты подтвердились. Все ампликоны, которые в дальнейшем включали в матрицу, присутствовали во всех повторностях со всеми прай-

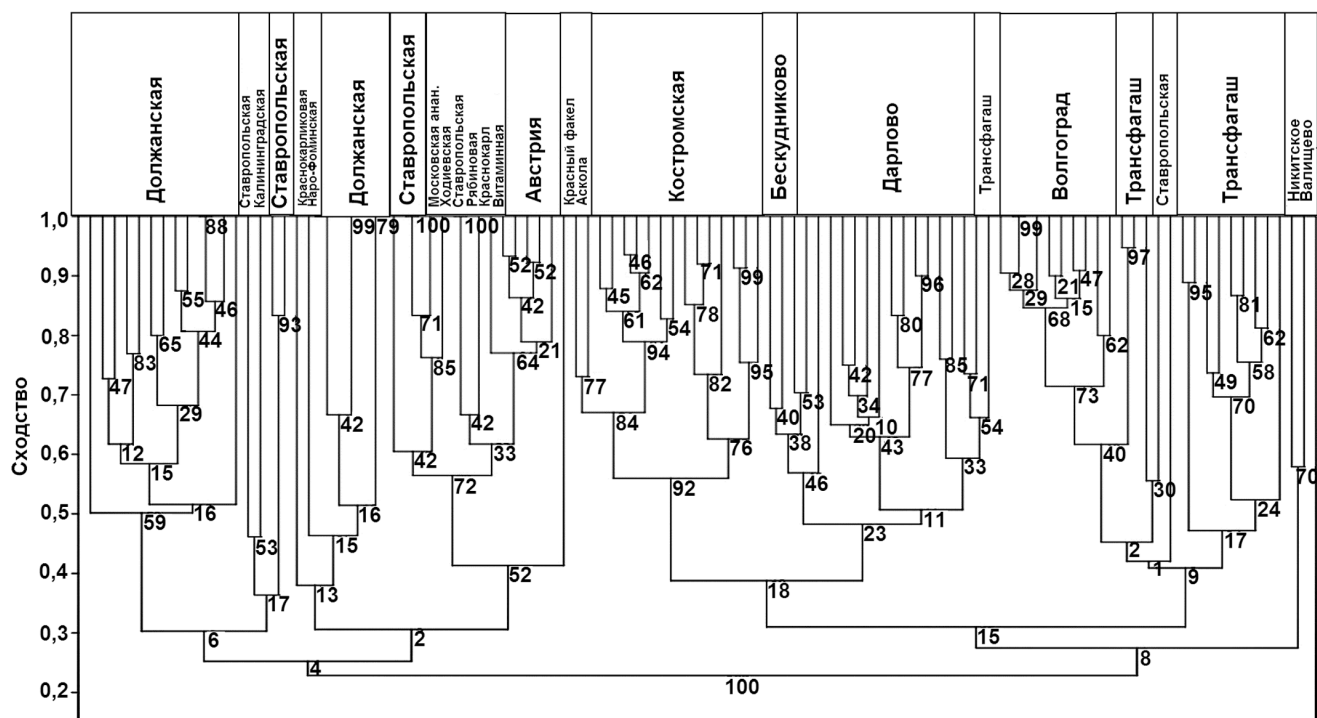


Рис. 2. Дендрограмма межпопуляционных и внутрипопуляционных взаимоотношений *Hippophaë rhamnoides* L., построенная методом UPGMA с использованием коэффициента Жаккара с помощью программного обеспечения Past3. Числами обозначены значения Bootstrap, число повторений 1000.

мерами. Всего было выявлено 157 локусов, из которых 144 были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов по каждому из праймеров варьировало от 18 (UBC 840) до 31 (UBC 807) в диапазоне размеров от 200 до 1200 п.н. С помощью бинарных матриц и с помощью программы Past3 на основе UPGMA была построена дендрограмма (рис. 2).

Общий уровень полиморфизма варьировал от 45,1% (UBC 807) до 100,0% (UBC 810) со средним уровнем 62,4%.

На дендрограмме UPGMA особи из географически близких популяций формировали кластеры (популяции Костромская, Дарлово, Волгоградская). Генетическое сходство между другими представителями различного эколого-географического происхождения, а также между вышеупомянутыми природными популяциями составляло от 0,825 (Витаминная и Австрийская) до 0,230 между двумя крупнейшими кластерами по коэффициенту Жаккара. Можно отметить, что сорта одинакового происхождения предсказуемо кластеризовались вместе, а наибольшим разнообразием отличались образцы, взятые из природных популяций. При этом у популяций из Румынии и Краснодарского края (коса Долгая) отмечен больший уровень внутривидового полиморфизма, чем у остальных популяций, собранных в Европейской части России. Возможно, это связано с тем, что территория центральной России не является естествен-

ным ареалом облепихи. По-видимому, все обнаруженные в этой части популяции (Нижний Новгород, Костромская и Ивановская области, Московская область) ведут свое происхождение от сортов, которые, в свою очередь, имели также достаточно ограниченный генофонд. В то же время территории, в популяции которых уровень генетического полиморфизма был очень высок (K_j — коэффициент Жаккара равен 0,23 в Ставропольской популяции), традиционно включаются ботаниками в зону естественного ареала облепихи. Между отдельными образцами в пределах некоторых популяций (Должанская, Костромская) разницы не было обнаружено; по-видимому, эти растения являются клонами, что в целом характерно для облепихи, склонной к вегетативному размножению путем образования поросли.

Таким образом, в процессе выполнения работы были подобраны праймеры, позволяющие эффективно выявлять межпопуляционный полиморфизм у *H. rhamnoides*, продемонстрирован высокий уровень генетического разнообразия вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 17-76-10060).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. ФАО, 2010. ВИЖ РАСХН, 2010. Москва. С. 359–380.
2. Das K., Hussain G.Sh., Mangla Y., Dar T.U.H., Chaudhary M., Thakur R.K., Tandon R., Raina S.N., Goel Sh. ISSR markers for gender identification and genetic diagnosis of *Hippophaë rhamnoides* ssp. *turkestanica* growing at high altitudes in Ladakh region (Jammu and Kashmir) // Protoplasma. 2017. Vol. 254. N 2. P. 1063–1077.
3. Rousi A. The genus *Hippophaë* L. A taxonomic study // Ann. Bot. Fennici. 1971. Vol. 8. N 3. P. 177–227.
4. Li T.S.C., Schroeder W.R. Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.): A multipurpose plant // HortTechnology. 1996. Vol. 6. N 4. P. 370–380.
5. Bernarth J., Foldesi D. Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.): a promising new medicinal and food crop // J. Herbs Spices Med. Plants. 1992. Vol. 1. N 1–2. P. 27–35.
6. Li H., Ruan Ch.-J., Teixeira da Silva J.A. Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophaë* L.) from China and other countries // Sci. Hortic. 2009. Vol. 123. N 2. P. 263–271.
7. Ruan C.J., Xie Q.L., Li D.Q. Function and benefit of sea buckthorn improving eco-environment of Loess Plateau // Proceedings of 12th ISCO Conference. Beijing. 2002. URL: <http://www.tucson.ars.ag.gov> (дата обращения: 19.02.2020).
8. Tian Ch., Lei Y., Shi S., Nan P., Chen J., Zhong Y. Genetic diversity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) populations in northeastern and northwestern China as revealed by ISSR markers // New Forest. 2004. Vol. 27. N 3. P. 229–237.
9. Земцова А.Я., Зубарев Ю.А., Гунин А.В., Иванова М.С. Оценка генетического полиморфизма образцов рода облепихи (*Hippophaë* L.) различного эколого-географического происхождения посредством ISSR-маркеров // Вавил. ж. генет. и селекции. 2017. Vol. 21. N 6. С. 623–629.
10. Tikunov Yu.M., Khrustaleva L.I., Karlov G.I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* // Euphytica. 2003. Vol. 131. N 1. P. 71–81.
11. Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // Mol. Ecol. 2004. Vol. 13. N 5. P. 1143–1155.
12. Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in einkorn wheat in relation to that of RFLP markers // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 96. N 1. P. 37–45.
13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. 1990. Vol. 12. N 1. P. 13–15.

Поступила в редакцию
22.05.2019 г.

После доработки
24.12.2019 г.

Принята в печать
05.02.2020 г.

RESEARCH ARTICLE

THE USE OF ISSR MARKERS FOR THE ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN SEA BUCKTHORN (*HIPPOPHAË RHAMNOIDES* L.) OF DIFFERENT ORIGINK.D. Bone^{1, 2}, I.V. Bocharkina³, G.I. Karlov¹, O.V. Razumova^{3, *}¹ Laboratory of Plant Genetic Engineering, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya st., 42, Moscow, 1275550, Russia;² Faculty of Agronomy and Biotechnology, Department of Genetics, Biotechnology, Breeding and Seed Production, Russian State Agrarian University—Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Timiryazevskaya st., 49, Moscow, 1275550, Russia;³ Laboratory of Applied Genomics and Crop Breeding, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya str. 42, Moscow, 127550, Russia

*e-mail: razumovao@gmail.com

Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) is a dioecious shrub, or tree. It is the perennial plant, the juvenile period of which continues from 3 to 5 years. Sea buckthorn is widely used in cosmetology, biotechnology, pharmacology, agriculture. It grows in many countries of Europe and Asia. This crop is a source of different vitamins, minerals, carotenoids and flavonoids. Phenotypic description does not give an accurate description of the taxon (species, subspecies, varieties, populations) so it means that we have to use molecular methods of analysis. The collection of Sea buckthorn with different ecological and geographical genesis was selected. It consists of herbarium specimens and natural populations. We selected ISSR-markers which are able to detect genotypic differences effectively. The dendrogram was built on the PCR basis. We revealed a high level of interspecies polymorphism, and it was also established that samples with similar ecological-geographical genesis tend to group into clusters, which are located at different genetic distances. The result of the research will help us to evaluate the gene pool of this crop, the diversity of forms, the similarity between them and it will help us to determine ecological and geographical origin of sea buckthorn, its evolution. So we will be able to select pairs for crossing and to define certification and identification of varieties before they reach the generative period.

Keywords: *Hippophaë rhamnoides*, ISSR markers, PCR, DNA polymorphism, phylogenetics, population genetics, dendrogram

Сведения об авторах

Боне Карина Даниэлевна — аспирант, лаборант-исследователь лаборатории генной инженерии растений Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: karinabone@mail.ru

Бочаркина Юлия Владимировна — магистр факультета биотехнологии (Life Sciences), Сколковский институт науки и технологий; лаборант-исследователь лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-18-25; e-mail: ju_football@mail.ru

Карлов Геннадий Ильич — чл.-корр. РАН, проф., д.б.н., директор Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: karlov@iab.ac.ru

Разумова Ольга Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр, лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: razumovao@gmail.com

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, содержат информацию, касающуюся последних важнейших открытий в области биологии. Разделы журнала соответствуют основным направлениям современных биологических исследований — биохимия, молекулярная биология, вирусология, биофизика, биоинженерия, физиология, ботаника, зоология, эволюционная биология, генетика, микробиология, биология развития, геронтология, экология и др. Издание печатает экспериментальные и методические работы, проблемно-аналитические обзоры и краткие сообщения.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Allerton Press, Inc.» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания полностью синхронны и выходят четыре раза в год. Желая опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте МАИК «Наука/Интерпериодика» (<http://www.maik.ru/ru/authors/agreement/>). Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей и сокращать статьи. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др. doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полуторный, отступ — 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (от 5 до 10, курсивом).

Подробности оформления рукописи можно посмотреть в статье-образце, выложенной на сайте журнала.

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

После списка литературы идет строка «Поступила в редакцию...», где ответственный секретарь редколлегии указывает дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи. Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Если в диаграмме авторами использовалась цветная заливка, то ее следует заменить контрастной штриховкой.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия. Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название тезисов // Название сборника тезисов (*как на обложке сборника*). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (*инициалы после фамилии*). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). *Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.*

7) **Электронная публикация.** Авторы (*инициалы после фамилии*). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — NY и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.

Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

Статья в сборнике:

Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilo V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Тезисы докладов (материалы) конференции:

Болеева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов–2012”, секция “Биология” (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

Автореферат диссертации:

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Особенности оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ...два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через две недели, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Обе корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.

Ответственный секретарь редколлегии — Моргунова Галина Васильевна (тел.: 8-495-938-27-01; 8-495-939-28-33).

Редакция располагается на биологическом факультете МГУ, «светелка» над зоной «А», комн. 702, прием авторов — вторник и четверг с 11 до 14 часов.

Дополнительную информацию и статью-образец можно найти на сайтах журнала:

<http://www.bio.msu.ru/doc/index.php?ID=324>

<http://vestnik-bio-msu.elpub.ru>.