

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 76 • № 1 • 2021 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Тарасова Е.О., Хоткина Н.А., Гайдуков А.Е., Балезина О.П.
Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах
мышцы под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида 3
- Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е.,
Шубина Т.А., Андреева Л.А. Влияние пептидов KKRRPGP
(Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) и KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro)
на параметры гемостаза, липидный профиль, уровень глюкозы крови
и изменение массы тела крыс на фоне метаболического синдрома
и дисфункции эндотелия. 10
- Киселевский Д.Б., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П., Самуилова О.В.,
Самуилов В.Д. Действие низкомолекулярного хитозана на клетки
эпидермиса из листьев гороха. 18
- Закалюкина Ю.В., Зайцев А.Р., Бирюков М.В.
Оценка целлюлозоразрушающей активности актинобактерий,
ассоциированных с муравьями 24
- Роккина А.Н., Праведникова А.Э., Шидловский Ю.В., Попова Е.В.,
Задорожная Л.В., Хомякова И.А. Индексы подкожного и висцерального
жироотложения и их связь с комплексом эндогенных и экзогенных факторов
в группе взрослого населения Республики Алтай 33

Краткие сообщения

- Контаров Н.А., Долгова Е.И., Погарская И.В., Контарова Е.О.,
Юминова Н.В. Кинетика термоинактивации вируса гриппа
A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии полиаллиламина. 41

Erratum

- Исправление в статье «Клетки китайского хомячка в биотехнологических
и геронтологических исследованиях» 47

CONTENTS

Research articles

- Tarasova E.O., Khotkina N.A., Gaydukov A.E., Balezina O.P. Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses 3
- Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Obergan T.Y., Grigorjeva M.E., Shubina T.A., Andreeva L.A. Effects of KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) and KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) peptides on hemostasis parameters, lipid profile, blood glucose level, and body weight changes in rats with metabolic syndrome and endothelial dysfunction 10
- Kiselevsky D.B., Shagdarova B.Ts., Varlamov V.P., Samuilova O.V., Samuilov V.D. Effect of low molecular weight chitosan on epidermal cells from pea leaves 18
- Zakalyukina Yu.V., Zaytsev A.R., Biryukov M.V. Study of cellulose-destroying activity of actinobacteria associated with ants. 24
- Rokkina A.N., Pravednikova A.E., Shidlovskii Yu.V., Popova E.V., Zadorozhnaya L.V., Khomyakova I.A. Subcutaneous and visceral fat indices and their relationship with the complex of endogenous and exogenous factors in the group of adult population of the Altai Republic 33

Short communications

- Kontarov N.A., Dolgova E.I., Kontarova E.O., Pogarskaya I.V., Yuminova N.V. Thermo-inactivation kinetics of strain A/BANGKOK/1/1979(H3N2) influenza virus in the presence of polyallylamine 41

Erratum

- Correction to: "Chinese hamster cells in biotechnological and gerontological research" . . . 47

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.822.3

Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида

Е.О. Тарасова*, Н.А. Хоткина, А.Е. Гайдуков , О.П. Балезина

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

*e-mail: cate1990@list.ru

Сравнивали изменения параметров миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) диафрагмы мышцы при экзогенной аппликации двух классических эндоканнабиноидов – 2-арахидоноилглицерина (2-AG) и анандамида (AEA). 2-AG (1 мкМ) вызывал постепенный (в течение 2 ч) прирост амплитуды МПКП на 50%, не влияя при этом на частоту спонтанной секреции ацетилхолина (АХ). Усиливающий секрецию эффект 2-AG предотвращался действием обратного агониста СВ1-рецепторов AM 251 или везамикола – блокатора везикулярного ацетилхолинового транспортера. AEA (30 мкМ), напротив, не вызвал изменений амплитуды МПКП, но индуцировал медленно развивающийся прирост частоты МПКП на 75%. Вызываемая AEA потенциация спонтанной секреции АХ предотвращалась AM 251, а также блокированием Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипином (1 мкМ) или ингибированием активности протеинкиназы А с помощью H89 (1 мкМ). Сделано заключение о способности как 2-AG, так и AEA оказывать пресинаптическое усиливающее влияние на спонтанную секрецию АХ. Стимулирующие эффекты эндоканнабиноидов, несмотря на активацию ими одних и тех же СВ1-рецепторов, не перекрываются и направлены на увеличение либо размера квантов АХ (в случае 2-AG), либо частоты секреции АХ (в случае AEA). Это позволяет предполагать вовлечение разных внутриклеточных мишеней и каскадов в разнонаправленные стимулирующие эффекты 2-AG и AEA в моторных синапсах мышцы.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, анандамид, 2-арахидоноилглицерин, миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП), Ca^{2+} -каналы L-типа, размер кванта

Ретроградная сигнализация в синапсах была открыта благодаря обнаружению в нейронах особого класса химических сигнализаторов, так называемых эндоканнабиноидов. Они представляют собой липофильные молекулы, образуемые из фосфолипидов мембраны в ответ на поступающие в нейрон сигналы [1]. В настоящее время наиболее известны два структурно различных эндоканнабиноида: 2-арахидоноилглицерин (2-AG) и анандамид (AEA). Оба они могут синтезироваться во время синаптической активности, что приводит к их высвобождению из постсинаптических нейронов и ретроградному действию на пресинаптические G-белок-сцепленные рецепторы. Это, в свою очередь, сопровождается торможением секреции медиатора в центральных синапсах [2, 3]. В последнее время активность эндоканнабиноидной системы обнаруживается и в периферических синапсах [4–6]. Для скелетной мускулатуры описаны ферментные системы синтеза и деградации эндоканнабиноидов [7–9], а также эндоканнабиноидные рецепторы (СВ-рецепторы), локализованные как на мышце, так и в области нервно-

мышечных синапсов [4, 5, 10, 11]. Для анализа функционального значения эндоканнабиноидной системы часто используют синтетические агонисты и антагонисты СВ-рецепторов, вызывающие как сходное, так и отличное от эффектов классических эндоканнабиноидов действие в синапсах [1, 3]. Ранее мы показали, что синтетический агонист СВ-рецепторов WIN 55,212-2 вызывает усиление спонтанной секреции АХ в моторных синапсах диафрагмы мышцы, предотвращаемое блокаторами СВ1-рецепторов [5]. Способны ли 2-AG и AEA оказывать аналогичное действие в моторных синапсах или же они обладают собственными эффектами, остается неизвестным. В связи с этим, данная работа была нацелена на сравнительный анализ эффектов 2-AG и AEA в моторных синапсах диафрагмы мышцы и сопоставление их действия с ранее обнаруженными эффектами WIN 55,212-2.

Материалы и методы

Объект исследования. Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препара-

тах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma – p. phrenicus*) взрослых (45–60-дневных) мышцей обеих полов линии BALB/c, полученных из лаборатории экспериментальных животных биологического факультета МГУ, Москва, Россия. Содержание животных и экспериментальные процедуры осуществлялись в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными. Заявка на проведение экспериментов с животными (95-ж) была одобрена комиссией МГУ по биоэтике. Всего в эксперименте было использовано 27 экспериментальных животных, и из каждого выделялся один нервно-мышечный препарат.

Электрофизиология. Мыши умерщвлялись посредством быстрого обезглавливания. Затем им вскрывали брюшную и грудную полость и извлекали левую половину диафрагмы с подходящим к ней диафрагмальным нервом. Изолированный нервно-мышечный препарат помещали в экспериментальную камеру объемом 3 мл, перфузируемую оксигенированным (95% O₂, 5% CO₂) раствором Лайли [12]. Внутриклеточную регистрацию спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5 М КСl (сопротивление кончика микроэлектрода 15–25 МОм). Сигналы регистрировали, используя усилители Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems, США) или Axoclamp-2B (Molecular Devices, США), и записывали их с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 (L-Card, Россия) с интерфейсом PowerGraph 6.0 на жесткий диск компьютера для последующего анализа в программе MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Критериями удачного введения микроэлектрода в зону концевой пластинки служили стабильный мембранный потенциал (МП) и значение времени нарастания МПКП на участке 10–90% амплитуды <1 мс. При снижении МП от исходного более чем на 5 мВ в ходе регистрации она прекращалась и сигналы от данного синапса не включались в выборку для дальнейшего анализа. В каждом исследованном синапсе МПКП регистрировали в течение 120 с. В контроле регистрировали МПКП в 5–7 синапсах, после чего нервно-мышечный препарат перфузировали раствором Лайли, содержащим исследуемые вещества. При исследовании действия 2-AG или АЕА регистрировали спонтанную активность разных синапсов на протяжении 2 ч перфузии нервно-мышечного препарата раствором, содержащим соответствующий эндоканнабиноид. При исследовании механизма действия эндоканнабиноидов соответствующие реагенты добавляли в перфузирующий раствор за 15 мин до добавления на их фоне 2-AG или АЕА. Далее в таких условиях регистрировали спонтанную активность разных синапсов в течение 2 ч. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов.

Анализ данных и статистика. Оценивали МП мышечных волокон, временной ход МПКП (время нарастания и время полуспада), их амплитуду и частоту. Значения параметров временного хода МПКП статистически значимо не менялись по сравнению с контролем во всех сериях экспериментов. Для нивелирования изменения движущей силы сдвига потенциала при изменениях МП стандартизировали значение амплитуд МПКП к МП -70 мВ по формуле $A_{ст.} = A \cdot (-70/МП)$, где A – зарегистрированная амплитуда МПКП, а $A_{ст.}$ – стандартизированная амплитуда МПКП. Статистический анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 6.0. Данные в тексте и на рисунках представлены как «среднее ± стандартная ошибка среднего». Нормальность распределения значений параметров МПКП оценивали с помощью критерия Д’Агостино-Пирсона. Достоверность различий между выборками оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа в случае нормальных распределений значений в каждой сравниваемой выборке. В случае распределения, отличного от нормального хотя бы в одной из выборок, использовали критерий Краскелла-Уоллеса. Различия между выборками считали значимыми при $p < 0,05$ (n – количество исследованных синапсов).

Материалы. В экспериментах использовали: эндоканнабиноиды АЕА (Merck, США) и 2-AG, обратный агонист СВ1-рецепторов – АМ 251; ингибитор протеинкиназы А Н89; ингибитор фосфолипазы С U73122; блокатор Ca²⁺ каналов L-типа – нитрендипин (все – Tocris Bioscience, США), блокатор везикулярного ацетилхолинового транспортера – везамикол (Enzo Life Sciences, США). Для приготовления стоковых растворов всех веществ, кроме Н89, в качестве растворителя использовали DMSO (диметилсульфоксид) (Хеликон, Россия). Растворителем для Н89 служила деионизированная H₂O. Конечная концентрация DMSO в рабочем растворе составляла не более 0,01% (v/v) и не оказывала самостоятельного действия на параметры спонтанной активности в моторных синапсах мыши.

Результаты и обсуждение

В первой части работы были исследованы изменения параметров МПКП нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши на фоне действия 2-AG (1 мкМ). Мы установили, что среднее значение МП мышечных волокон не менялось под действием 2-AG на протяжении 2 ч его аппликации. В течение этого времени не регистрировали изменений средней частоты МПКП: в контроле она составила $0,46 \pm 0,04$ Гц ($n = 16$), $0,46 \pm 0,04$ Гц в первый ($n=16$) и $0,38 \pm 0,04$ Гц ($n=17$, $p > 0,05$) во второй час аппликации. При этом наблюдалось постепенное возрастание амплитуды МПКП от

1,35±0,11 мВ в контроле до 2,03±0,24 мВ ко второму часу действия 2-АГ ($p<0,05$), которое сохранялось при отмывке в течение одного часа (рис. 1А). Известно, что возрастание амплитуды МПКП может иметь как пре-, так и постсинаптическую природу [13]. Для проверки возможной природы обнаруженного эффекта 2-АГ мы ингибировали везикулярный транспорт АХ в синаптические везикулы. Сам везикулярный транспорт не оказывает влияния на амплитуду МПКП на протяжении его длительного воздействия [4, 12], но в его присутствии 2-АГ оказался не способен вызывать прирост амплитуды МПКП (рис. 1Б). Поскольку 2-АГ может оказывать действие на оба типа СВ-рецепторов, но СВ1 более распространен в нервной системе [1], для проверки рецепторного действия 2-АГ был выбран обратный агонист СВ1-рецепторов АМ 251 (1 мкМ), широко используемый для предотвращения развития СВ1-опосредованных эффектов. Сам АМ 251 не приводил к изменению параметров МПКП [4, 5], однако на его фоне 2-АГ не вызывал прироста амплитуды МПКП (рис. 1В). Полученные данные позволяют предполагать, что обнаруженные нами эффекты 2-АГ могут быть результатом его пресинаптического рецепторного действия на СВ1-рецепторы. Их активация запускает внутриклеточный сигнальный каскад, конечной мишенью которого является стимулирование накачки АХ в везикулы и повышение, тем самым, размера спонтанно секреторных квантов. Аналогичный эффект везикулярного транспорта, заключающийся в предотвращении отставленного по времени увеличения амплитуды МПКП под действием агонистов эндоканнабиноидных рецепторов, был недавно описан для нервно-мышечных синапсов диафрагмы мыши [4].

Во второй части работы был проведен анализ эффектов иного эндоканнабиноида – АЕА (30 мкМ). Как и в случае с 2-АГ, на фоне действия АЕА не происходило статистически значи-

мых изменений МП мышечных волокон. В отличие от амплитуды МПКП, возросшей в присутствии 2-АГ, параметром МПКП, чувствительным к действию АЕА, оказалась их частота: происходило выраженное увеличение ее среднего значения от 0,37±0,03 Гц ($n=15$) в контроле до 0,65±0,05 Гц на второй час аппликации АЕА ($n=17$, $p<0,05$) (рис. 2А). При этом не наблюдалось достоверных изменений амплитуды МПКП: в контроле среднее значение этого параметра составило 1,61±0,14 мВ, а на втором часу воздействия АЕА – 1,64±0,14 ($p>0,05$). Для тестирования рецепторной специфичности АЕА-индуцированного прироста частоты МПКП также был использован АМ 251 (1 мкМ). Оказалось, что на фоне обратного агониста СВ1-рецепторов полностью предотвращается прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА (рис. 2Б). Это дает основание предполагать, что, как и в случае с 2-АГ, АЕА-индуцированный эффект является специфическим и, по-видимому, связан с активацией именно СВ1-рецепторов.

Возможными причинами прироста частоты МПКП в моторных синапсах могут являться повышение активности ряда ферментов – протеинкиназы А (РКА), фосфолипазы С (РЛС) и/или повышение уровня Ca^{2+} в терминали с участием разных типов Ca^{2+} -каналов [5, 14]. В связи с этим, далее мы исследовали, будет ли прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА, проявляться на фоне действия ингибиторов РЛС или РКА, а также блокирования Ca^{2+} -каналов. Оказалось, что ингибитор РЛС U73122 (5 мкМ), который сам по себе не оказывает влияния на параметры МПКП [12], не способен предотвратить прирост частоты МПКП, вызываемый АЕА (рис. 2В). Этот факт расходится с ранее полученными нами данными о том, что при активации СВ1-рецепторов их синтетическим агонистом WIN 55,212-2, статистически значимый прирост частоты МПКП предотвращался блоки-

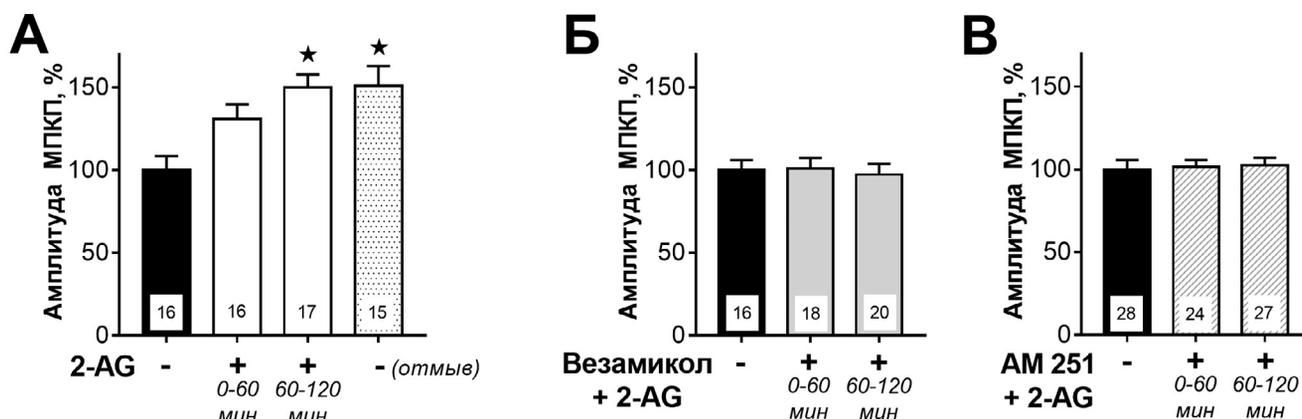


Рис. 1. Пресинаптический механизм стимулирующего действия 2-АГ (1 мкМ) на спонтанную секрецию АХ. (А) Увеличение амплитуды МПКП при действии 2-АГ. (Б) Амплитуда МПКП в контроле и при действии 2-АГ в присутствии ингибитора везикулярного АХ транспортера – везамикола (1 мкМ). (В) Амплитуда МПКП в контроле и при действии 2-АГ в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов АМ 251 (1 мкМ). Средние значения амплитуды МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). Цифры внутри столбцов гистограмм – количество исследованных синапсов в соответствующих выборках. ★ – $p<0,05$, по сравнению с контролем.

рованием активности PLC и протеинкиназы С, но не ингибированием РКА [5]. В данной работе, при использовании АЕА в качестве агониста СВ1-рецепторов, прирост частоты МПКП предотвращался с помощью ингибитора РКА Н89 (1 мкМ), но не предотвращался ингибитором PLC (рис. 2Г). Наконец, нитрендипин, избирательный блокатор потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа, который сам по себе достоверно не влиял на параметры МПКП [15], также предотвращал прирост частоты МПКП, вызванный АЕА (рис. 2Д). Последний факт свидетельствует о Ca^{2+} -зависимости эффекта прироста частоты МПКП в моторных нервных терминалях под действием АЕА, что созвучно с нашими предыдущими данными о зависимости увеличения частоты МПКП при действии WIN 55,212-2 от депонированного Ca^{2+} и активности рианодиновых рецепторов [5], которые, как правило, активируются и выбрасывают Ca^{2+} из депо в ответ на вход Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы L-типа. Способность этих каналов в случае усиления их активности с помощью действия ферментов (РКА) либо их агониста BayK8644 вызывать вход Ca^{2+} в терминаль и приводить к приросту частоты МПКП ранее описана

в литературе [16, 17]. Мы впервые показали, что прирост частоты МПКП, индуцируемый АЕА, связан не только со срабатыванием пресинаптических Ca^{2+} -каналов L-типа, но и с активацией РКА в терминалях моторных синапсов. Это позволяет предполагать, что в данном случае действие АЕА опосредуется активацией не канонического G_i -белка, а другого – вероятно, G_s -типа. Как известно, именно этот тип G-белка является стимулятором аденилатцикласного сигнального каскада, направленного на активацию РКА. В свою очередь, одной из мишеней такой сигнализации в моторных нервных терминалях мыши являются пресинаптические Ca^{2+} -каналы L-типа [15].

Возможность вовлечения в реализацию действия эндоканнабиноидов сигнального пути, стимулирующего аденилатциклазу и РКА, значительно менее исследована по сравнению с классической активацией G_i -зависимых сигнальных путей. Вместе с тем, такое предположение выглядит вполне правомочным. Это связано с открытием у эндоканнабиноидов, при действии на их рецепторы, многочисленных проявлений смещенного агонизма [18]. В частности, обсуждается способность СВ1-рецептора под действием разных агонистов

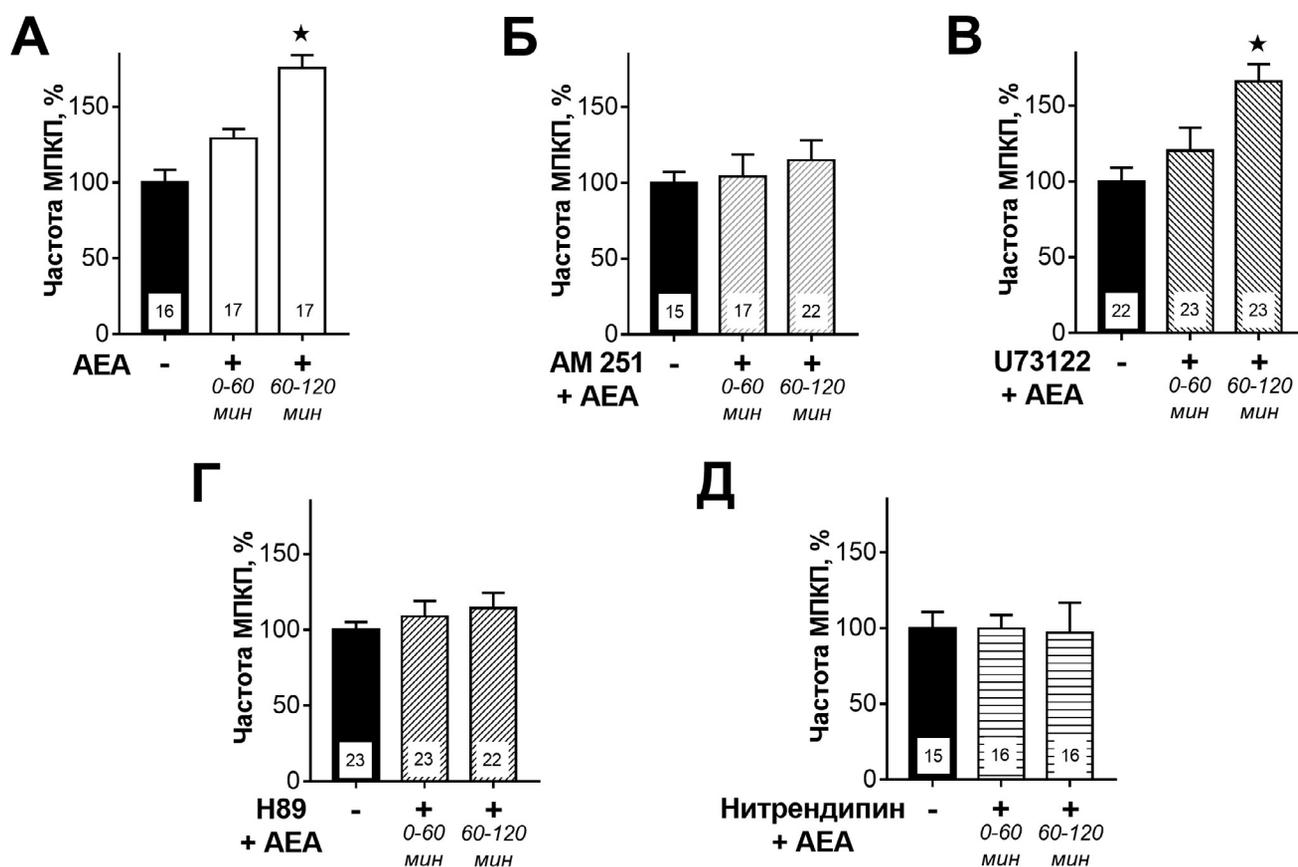


Рис. 2. Пресинаптический механизм стимулирующего действия АЕА (30 мкМ) на спонтанную секрецию АХ. (А) Увеличение частоты МПКП при действии АЕА. (Б) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии обратного агониста СВ1-рецепторов AM 251 (1 мкМ). (В) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии ингибитора PLC U73122 (5 мкМ). (Г) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии ингибитора РКА Н89 (1 мкМ). (Д) Частота МПКП в контроле и при действии АЕА в присутствии блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нитрендипина (1 мкМ). Средние значения частоты МПКП нормализованы к контролю (принят за 100%). Цифры внутри столбцов гистограмм – количество исследованных синапсов в соответствующих выборках. * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

нистов либо напрямую активировать G_s -белок [19], либо ингибировать G_i -белок и, тем самым, усиливать тоническую активность G_s -белок-сцепленного каскада и РКА [20]. Наконец, недавно описана способность агонистов эндоканнабиноидных рецепторов активировать каскад с участием G_s -белка и РКА не напрямую, а посредством сцепки с β -аррестинами [21]. Какой именно тип G-белков и опосредуемых ими реакций стимулирует активность Ca^{2+} -каналов L-типа и РКА, приводя к стойкому возрастанию частоты МПКП под действием АЕА в моторных синапсах, предстоит выяснить в дальнейших экспериментах.

Обнаруженное в нашей работе медленное развитие эффектов эндоканнабиноидов, занимающее порядка 2 ч от начала их аппликации, отмечалось в моторных синапсах и ранее, при исследовании действия агонистов СВ-рецепторов на параметры МПКП [4, 5], а также в синапсах центральной нервной системы при СВ-опосредованной модуляции долговременной пластичности [2, 18]. Такая динамика проявления эффектов, по-видимому, является следствием вовлечения разных по протяженности сигнальных путей и разных конечных мишеней [22]. Конкретные причины медленно развивающихся эффектов эндоканнабиноидов в моторных синапсах – это вопрос, безусловно требующий дальнейших исследований.

Таким образом, сравнительный анализ эффектов двух разных по структуре эндоканнабиноидов впервые показал, что 2-АГ и АЕА вызывают пресинаптические рецепторные и усиливающие спонтанную секрецию АХ воздействия в моторных синапсах мышцы. 2-АГ увеличивает амплитуду МПКП, не изменяя их частоту, а АЕА – наоборот, увеличивает частоту МПКП, не влияя на их амплитуду.

Примеры облегчающих влияний эндоканнабиноидов на секрецию медиаторов, хотя и отмечены в литературе, но остаются немногочисленными [18, 23]. Они рассматриваются сегодня как проявление значительно более широкого, чем предполагалось ранее, спектра функциональной активности эндоканнабиноидов в синапсах. Активно обсуждается способность СВ-рецепторов к смещенному агонизму и возможности их взаимодействия не только с каноническим G_i -белком, но и другими типами G-белков (G_q и/или G_s) [18, 22], а также взаимодействие СВ-рецепторов с β -аррестинами, что запускает отдельные сигнальные каскады. Гетерорецепторные комплексы, образуемые СВ1-рецепторами с другими мембранными рецепторами клеток, также могут опосредовать атипичные эффекты эндоканнабиноидов [24]. Соответственно, отмечаемые в литературе расхождения по направленности, мишеням и временному диапазону действия эндоканнабиноидов сейчас постепенно находят свое объяснение из-за

функциональной полипотентности этих сигнальных молекул [22, 24]. Характерная для эндоканнабиноидов сложная детерминированность и неоднозначность физиологического действия, по-видимому, проявилась и в моторных синапсах млекопитающих и стала причиной разнонаправленных стимулирующих эффектов 2-АГ и АЕА, несмотря на активацию ими одних и тех же пресинаптических СВ1-рецепторов. Детальные механизмы такого действия 2-АГ и АЕА, опосредуемого СВ1-типом рецепторов, еще предстоит выяснить.

На наш взгляд, эффекты экзогенных 2-АГ и АЕА, проявляющиеся при их длительном действии и имеющие долговременные проявления, могут служить моделью тонических конститутивных эффектов эндоканнабиноидов в моторных синапсах. Возможный вклад именно тонических эффектов эндоканнабиноидов в поддержание гомеостаза нейронов и синапсов в раннем онтогенезе обсуждается и в отношении синапсов центральной нервной системы [25]. При этом очевидно, что в иных условиях функционирования синапсов, в частности, в случае высвобождения эндоканнабиноидов из мышечных волокон или перисинаптических шванновских клеток в покое или при мышечном сокращении, эффекты эндоканнабиноидов могут отличаться. Их проявление еще предстоит выяснить.

Подводя итог полученным в работе данным, можно констатировать, что анализ действия двух классических эндоканнабиноидов (2-АГ и АЕА) в моторных синапсах мышцы впервые выявил их неканоническое однонаправленное действие в виде индукции медленно развивающейся потенциации спонтанной секреции АХ. Несмотря на активацию одного и того же типа рецепторов (СВ1-типа), 2-АГ и АЕА вызвали направленное увеличение соответственно либо амплитуды МПКП (отражающей рост размера квантов АХ), либо частоты МПКП (отражающей учащение спонтанного выброса квантов АХ). Мы показали, что направленные на разные параметры МПКП стимулирующие эффекты предполагают вовлечение разных сигнальных путей и их мишеней, в том числе активацию РКА и Ca^{2+} -каналов L-типа, сопряженную с приростом частоты МПКП при действии АЕА, и увеличение загрузки АХ в синаптические везикулы при действии 2-АГ.

В совокупности полученные данные расширяют представления о возможных проявлениях функциональной активности эндоканнабиноидов, не только в режиме «по требованию» в ответ на вызванную активность синапсов, но, возможно, и в тоническом режиме в синапсах в состоянии покоя. Очевидно, что всестороннее осмысление множественных и неоднозначных эффектов функционирования эндоканнабиноидной сигнальной системы в моторных синапсах требует дальнейшего анализа.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00616а). Проведение экспериментов осуществлялось

с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hillard C.J. Circulating endocannabinoids: From whence do they come and where are they going? // *Neuropsychopharmacology*. 2018. Vol. 43. N 1. P. 155–172.
- Heifets B.D., Castillo P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. Vol. 71. P. 283–306.
- Ohno-Shosaku T., Tanimura A., Hashimoto-dani Y., Kano M. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission // *Neuroscientist*. 2012. Vol. 18. N 2. P. 119–132.
- Morsch M., Protti D.A., Cheng D., Braet F., Chung R.S., Reddel S.W., Phillips W.D. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. 2018. Vol. 8. N 1: 4685.
- Gaydukov A.E., Dzhalagoniya I.Z., Tarasova E.O., Balezina O.P. The participation of endocannabinoid receptors in the regulation of spontaneous synaptic activity at neuromuscular junctions of mice // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2020. Vol. 14. N 1. P. 7–16.
- Ge D., Odierna G.L., Phillips W.D. Influence of cannabinoids upon nerve-evoked skeletal muscle contraction // *Neurosci. Lett.* 2020. Vol. 725: 134900
- Cavuto P., McAinch A.J., Hatzinikolas G., Janovska' A., Game P., Wittert G.A. The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 364. N 1. P. 105–110.
- Crespillo A., Suarez J., Bermudez-Silva F.J., Rivera P., Vida M., Alonso M., Palomino A., Lucena M.A., Serrano A., Perez-Martin M., Macias M., Fernandez-Llebrez P., Rodriguez de Fonseca F. Expression of the cannabinoid system in muscle: Effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade // *Biochem. J.* 2011. Vol. 433. N 1. P. 175–185.
- Hutchins-Wiese H.L., Li Y., Hannon K., Watkins B.A. Hind limb suspension and long-chain omega-3 PUFA increase mRNA endocannabinoid system levels in skeletal muscle // *J. Nutr. Biochem.* 2012. Vol. 23. N 8. P. 986–993.
- Maccarrone M., Bab I., Biro T., Cabral G.A., Dey S.K., Di Marzo V., Konje J.C., Kunos G., Mechoulam R., Racher P., Sharkey K.A., Zimmer A. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC // *Trends Pharmacol. Sci.* 2015. Vol. 36. N 5. P. 277–296.
- Oláh T., Bodnar D., Toth A., Vincze J., Fodor J., Reischl B., Kovacs A., Ruzsnavszky O., Dienes B., Szentesi P., Friedrich O., Csernoch L. Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca²⁺ release and regulates excitation–contraction coupling in mammalian skeletal muscle // *J. Physiol.* 2016. Vol. 594. N 24. P. 7381–7398.
- Gaydukov A., Bogacheva P., Tarasova E., Molchanova A., Miteva A., Pravdivceva E., Balezina O. Regulation of acetylcholine quantal release by coupled thrombin/BDNF signaling in mouse motor synapses // *Cells*. 2019. Vol. 8. N 7: 762.
- Балежина О.П., Гайдуков А.Е. Пресинаптическая регуляция размера квантов медиатора // *Усп. физиол. наук*. 2018. № 2. С. 20–44.
- Losavio A., Muchnik S. Role of L-type and N-type voltage-dependent calcium channels (VDCCs) on spontaneous acetylcholine release at the mammalian neuromuscular junction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 841. P. 636–645.
- Tarasova E.O., Miteva A.S., Gaydukov A.E., Balezina O.P. The role of adenosine receptors and L-type calcium channels in the regulation of the mediator secretion in mouse motor synapses // *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2015. Vol. 9. N 4. P. 318–328.
- Urbano F.J., Depetris R.S., Uchitel O.D. Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals // *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* 2001. Vol. 441. N 6. P. 824–831.
- Atchison W.D., O'Leary S.M. Bay K 8644 increases release of acetylcholine at the murine neuromuscular junction // *Brain Res.* 1987. Vol. 419. N 1–2. P. 315–319.
- Chevalere V., Heifets B.D., Kaeser P.S., Südhof T.C., Castillo P.E. Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1α // *Neuron*. 2007. Vol. 54. N 5. P. 801–812.
- Glass M., Felder C.C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: Evidence for a G(s) linkage to the CB1 receptor // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. N 14. P. 5327–5333.
- Eldeeb K., Leone-Kabler S., Howlett A.C. CB1 cannabinoid receptor-mediated increases in cyclic AMP accumulation are correlated with reduced Gi/o function // *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2016. Vol. 27. N 3. P. 311–322.
- Delgado-Peraza F., Ahn K.H., Nogueras-Ortiz C., Mungrue I.N., Mackie K., Kendall D.A., Yudowski G.A. Mechanisms of biased β-arrestin-mediated signaling downstream from the cannabinoid 1 receptor // *Mol. Pharmacol.* 2016. Vol. 89. N 6. P. 618–629.
- Ibsen M.S., Connor M., Glass M. Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias // *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017. Vol. 2. N 1. P. 48–60.
- Piette C., Cui Y., Gervasi N., Venance L. Lights on endocannabinoid-mediated synaptic potentiation // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13: 132.
- Haspula D., Clark M.A. Cannabinoid receptors: An update on cell signaling, pathophysiological roles and therapeutic opportunities in neurological, cardiovascular, and inflammatory diseases // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 20: 7693.
- Gonzalez-Islas C., Garcia-Bereguain M.A., Wenner P. Tonic and transient endocannabinoid regulation of AMP aergic miniature postsynaptic currents and homeostatic plasticity in embryonic motor networks // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32. N 39. P. 13597–13607.

Поступила в редакцию 17.11.2020 г.

После доработки 23.12.2020 г.

Принята в печать 11.01.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Spontaneous acetylcholine release potentiation induced by 2-arachidonoylglycerol and anandamide in mouse motor synapses

E.O. Tarasova*, N.A. Khotkina, A.E. Gaydukov , O.P. Balezina

Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia

**e-mail: cate1990@list.ru*

We compared the changes in miniature endplate potential (MEPP) parameters of the mouse diaphragm caused by exogenous application of two classical endocannabinoids – 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (1 μM) and anandamide (AEA) (30 μM). 2-AG caused a slowly developing stable increase in MEPP amplitude by 50%, without affecting the frequency of the MEPPs. This effect was prevented by AM-251, an inverse agonist of CB1-receptors, as well as by vesamicol, a blocker of the vesicular ACh transporter. On the contrary, AEA did not cause significant changes in the MEPP amplitude, but induced a slowly developing (within 2 hours) increase in MEPP frequency by on average 75%. The effect of AEA was prevented by AM-251 (1 μM) as well as by blocking of L-type Ca^{2+} -channels with nitrendipine (1 μM) and inhibition of PKA activity by H89 (1 μM). We concluded that both 2-AG and AEA are able to exert a non-canonical facilitating presynaptic effect on spontaneous ACh release. Even though these endocannabinoids activate the same type of CB-receptors, their facilitating effects do not overlap and are strictly aimed either at potentiating the size of ACh quanta (in case of 2-AG) or increasing the frequency of MEPP (in case of AEA). We assume that different intracellular targets and signaling pathways may be involved in the differentiated facilitating effects of 2-AG and AEA in mouse neuromuscular junctions.

Keywords: *neuromuscular junction, anandamide, 2-arachidonoylglycerol, miniature endplate potentials (MEPPs), L-type Ca^{2+} -channels, quantal size*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 19-04-00616a.

Сведения об авторах

Тарасова Екатерина Олеговна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92; e-mail: cate1990@list.ru

Хоткина Наталья Александровна – магистр первого года обучения кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92, e-mail: natashakhotkina@yandex.ru

Гайдуков Александр Евгеньевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92, e-mail: gaydukov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-1382>

Балезина Ольга Петровна – докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-92, e-mail: balezina@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.115.3:612.115.064

Влияние пептидов KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) и KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) на параметры гемостаза, липидный профиль, уровень глюкозы крови и изменение массы тела крыс на фоне метаболического синдрома и дисфункции эндотелия**Н.Ф. Мясоедов¹, Л.А. Ляпина² , Т.Ю. Оберган^{2,*} , М.Е. Григорьева² , Т.А. Шубина² , Л.А. Андреева¹**¹*Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, площадь акад. Курчатова, д. 2;*²*Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: tobergan@mail.ru*

Лизин- и аргининсодержащие пептиды Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro и Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro были введены интраназальным способом (ежедневно через каждые 24 ч в течение 7 сут в дозе 100 мкг/кг) животным (лабораторным крысам) с экспериментальным метаболическим синдромом и дисфункцией эндотелия. Метаболический синдром моделировали высококалорийной диетой в течение всего периода эксперимента, дисфункцию эндотелия – внутривенной инъекцией L-NAME (ежедневно через каждые 24 ч в дозе 10 мг/кг в течение 5 сут). Пептиды вызывали противосвертывающий, гипогликемический, гиполипидемический эффекты и замедляли рост массы тела подопытных крыс. Они влияли как на первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, снижая агрегацию тромбоцитов, так и на все звенья плазменного гемостаза, повышая антикоагулянтную, фибриндеполимеризационную и ферментативную фибринолитическую активность, а также улучшая антифибринстабилизирующие свойства плазмы, и снижали в ней концентрацию фибриногена. Одновременно с этим исследуемые пептиды уменьшали содержание общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов, увеличивая концентрацию холестерина липопротеидов высокой плотности. Указанные эффекты проявлялись через 20 ч после последнего введения пептидов и сохранялись, хотя и в меньшей степени, через 7 сут после отмены их введения. В связи с этим можно говорить о пролонгированном действии в организме обоих пептидов глипролинового ряда, которые имеют в своей структуре лизиновые и аргининовые аминокислотные остатки, и о способности данных соединений защищать организм от развития метаболического синдрома и дисфункции эндотелия. Максимальный эффект вызывал Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro что, возможно, обусловлено структурными особенностями данного пептида.

Ключевые слова: метаболический синдром, лизин- и аргининсодержащие пептиды, дисфункция эндотелия, масса тела, уровень глюкозы, липидный профиль, система гемостаза

Метаболический синдром (МС) – в настоящее время широко распространенная в мире патология, связанная с нарушением обмена веществ, которая способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний и относится к важной клинической проблеме. Основными детерминантами МС являются абдоминальное ожирение – предиктор развития сахарного диабета 2 типа, инсулинорезистентность (ИР), гипертония, гипергликемия, дислипидемия, а также отрицательное воздействие на эндотелий [1, 2]. Общим механизмом, связывающим все эти нарушения, служит взаимодействие между эндотелием и клетками, участ-

вующими в воспалительных реакциях [3]. Чрезмерное увеличение жировой ткани при МС запускает секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов [4], что приводит к развитию воспалительных процессов. Ключевым для развития ИР, индуцированной ожирением, считается взаимодействие СС-хемокина – MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1) с его рецептором CCR2. Также установлено, что хемокиновый рецептор CCR5 усиливает воспалительную реакцию в жировой ткани мыши [5]. Ухудшение утилизации глюкозы и дислипидемии, которые возникают вследствие ИР, приводят к развитию диабе-

тических микро- и макрососудистых осложнений [6] и, в дальнейшем, к органным повреждениям и атеросклерозу [7–9].

При нарушениях обмена веществ часто отмечается дисфункция эндотелия, т.е. уменьшение эндотелий-зависимого расслабления артерий, опосредуемого оксидом азота (NO). NO – важный биологический медиатор, обеспечивающий нормальное функционирование сердечно-сосудистой системы, что связано с его вазодилататорным действием, торможением пролиферации гладкомышечных клеток, а также участием в процессах агрегации и адгезии тромбоцитов [10]. NO синтезируется в организме из L-аргинина NO-синтазами в ходе комплексной окислительной реакции. Обнаружено, что введение экзогенного L-аргинина больным с гиперхолестеринемией улучшает эндотелий-зависимую вазодилатацию сосудов, нарушенную окисленными липопротеидами низкой плотности, ограничивает дисфункцию эндотелия и предотвращает повышенную свертываемость крови [11].

Ранее было показано, что короткие пептиды, которые имеют в своем составе аргинин, оказывают антикоагулянтное и фибринолитическое действие на процессы гемостаза в условиях развития МС. Подобным образом действуют и лизинсодержащие пептиды [12]. В то же время доказано, что аминокислота лизин снижает среднесуточный прирост брюшного жира и потребление корма у цыплят [13]. Однако остается открытым вопрос, каково влияние аргинин- и лизинсодержащих пептидов глипролинового ряда на ряд функций организма.

Целью настоящего исследования было изучение нейтрализации нарушений гемостаза, липидного и углеводного обмена, вызванных развитием МС с углубленной дисфункцией эндотелия, под влиянием регуляторных пептидов Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro (KKRRPGP) и Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro (KRRKPGP), одновременно содержащих в своей структуре аргинин и лизин.

Материалы и методы

В настоящем исследовании использованы пептиды глипролинового ряда KKRRPGP и KRRKPGP, которые были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН (Москва, Россия).

В экспериментах, проведенных с соблюдением этических принципов работы с лабораторными животными и одобренных локальным этическим комитетом (Институт молекулярной генетики РАН, Москва), были использованы крысы-самцы линии Wistar массой тела 300–400 г. Животных содержали в пластиковых клетках в стандартных лабораторных условиях при искусственном освещении (12 ч/12 ч светлое/темное время), принудительной (12 раз в час) вентиляции, температуре 22–26°C и относительной влажности 50–70%.

Для индуцирования метаболических нарушений животных содержали на высококалорийной диете (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг [14]. Состав ВКД, включающей избыток углеводов, холестерина и насыщенных жирных кислот: жир свиной (15%), манная каша на молоке (30%), мука пшеничная и хлеб (15%), сахарный песок (5%), животные жиры (25%), стандартный гранулированный комбикорм «Лабораторкорм» (Москва, Россия) (10%). В качестве питья животные получали 10%-ный раствор глюкозы.

Проведено 2 серии экспериментов.

В **первой** серии осуществляли моделирование дисфункции эндотелия введением L-NAME у крыс с МС (рис.). Для этого животные (N=32) в течение 6 нед находились на ВКД для развития метаболических нарушений, после чего, при продолжающейся ВКД, крысы (группа «МС + L-NAME», N=24) получали препарат L-NAME (Sigma, США) (метилловый эфир N-нитро-L-аргинина) внутривентриально ежедневно в течение 5 сут в ежедневной дозе 10 мг/кг массы тела для индуцирования дисфункции эндотелия сосудов. Животным групп «Здоровые» (в качестве контро-

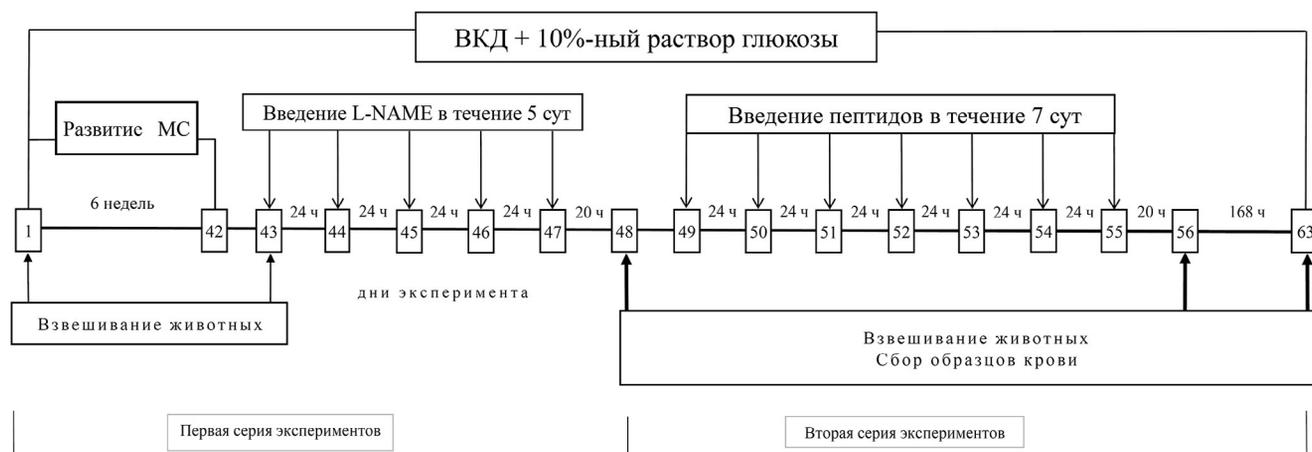


Рисунок. Схема проведения эксперимента. ВКД – высококалорийная диета, МС – метаболический синдром.

ля, N=8) и «МС» (без L-NAME, N=8) с целью сравнения параметров крови в условиях метаболических нарушений как при дополнительном введении L-NAME, так и без него в те же сроки и тем же способом вводили 0,85%-ный NaCl. Через 20 ч после последнего введения L-NAME у животных брали кровь из *v. jugularis* с использованием в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия для проведения биохимических анализов. Затем животных групп «МС + L-NAME» и «Здоровые» использовали в дальнейших экспериментах.

Во второй серии опытов выявляли влияние на параметры гемостаза, липидного профиля, уровень глюкозы и массу тела двух пептидов KKRRPGP и KRRKPGP после их многократного интраназального введения животным с МС и дисфункцией эндотелия. Животные «МС + L-NAME» (N = 24) были разделены на 3 группы по 8 крыс в каждой: группа «МС + L-NAME» (положительный контроль) получала ежедневно в течение 7 сут один раз в сутки 0,85%-й NaCl в объеме 20 мкл; группа «МС + L-NAME + KKRRPGP» получала пептид KKRRPGP, а группа «МС + L-NAME + KRRKPGP» – пептид KRRKPGP в дозе 100 мкг/кг в 20 мкл 0,85%-ного NaCl в те же сроки и подобным же образом. Дополнительно использовали группу интактных крыс («Здоровые», отрицательный контроль), которых содержали на стандартном гранулированном комбикорме (калорийность 2950 ккал/кг). Через 20 ч после последнего (7-го) введения препаратов (56-е сут эксперимента) и через 7 сут после их отмены (63-е сут) у животных натошак забирали образцы крови из *v. jugularis* для проведения биохимических анализов.

В плазме крови определяли фибринолиз по следующим тестам: суммарной (СФА), неферментативной (или фибриндеполимеризационной – ФДПА) и ферментативной (ФФ) фибринолитической активности, активности тканевого активатора пламиногена (ТАП), времени лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС); антикоагулянтную активность по тестам: активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени, агрегации тромбоцитов (АТ), индуцированной 10^{-6} М АДФ с использованием наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия); концентрацию фибриногена и активность фактора XIIIa с использованием наборов реагентов фирмы «Ренам» (Россия) [15].

Показатели липидного обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Россия). При этом определяли концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (Хс-ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП) и триглицеридов.

Концентрацию тощачковой глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One

Touch Horison (США) с использованием специальных тест-полосок для данного прибора.

В течение эксперимента определяли массу тела животных: до начала ВКД (1-е сут), через 6 нед ВКД перед введением L-NAME (43-е сут), перед началом введения пептидов (48-е сут), а также через 20 ч (56-е сут) и спустя 7 сут (168 ч) после окончания введения пептидов (63-е сут).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Распределение данных оценивали по тесту Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk). Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрического критерия межгруппового сравнения Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis).

Результаты и обсуждение

Первая серия экспериментов. Показатели гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы крови и масса тела при моделировании у крыс с МС дисфункции эндотелия. Известно, что при развитии МС у крыс происходит повышение концентрации холестерина, триглицеридов, глюкозы крови, развивается ожирение, а также активируются процессы коагуляции крови. Как видно из данных табл. 1, содержание крыс в течение 6 нед на ВКД приводило к развитию гиперкоагуляции в крови животных группы «МС»: повысилась свертываемость крови по тесту АЧТВ на 11,5%, тромбиновое время – на 8,7%, активность FXIIIa – на 20%, концентрация фибриногена – на 50%, снизился фибринолиз по данным оценки СФА, ФДПА, ФФ, активности ТАП, ВЛЭС – на 36, 40, 42, 28, 83% соответственно; АТ повысилась на 15% по сравнению с контролем (здоровые животные). На этом фоне введение препарата L-NAME способствовало еще более значительной гиперкоагуляции и гипофибринолизу в крови крыс. Так, АТ и активность фактора XIIIa повысились на 39% и 13%, АЧТВ укоротилось на 20%, а показатели фибринолиза снизились на 21–30% по сравнению с группой «МС». При этом в обеих группах с МС (с L-NAME и без него) отмечено достоверное повышение концентрации общего холестерина, триглицеридов, Хс-ЛПНП и снижение концентрации Хс-ЛПВП по сравнению с контролем (хотя различия между группами «МС» и «МС + L-NAME» были недостоверны). Кроме того, прирост массы тела с 43-х по 48-е сут эксперимента в группах «МС» и «МС + L-NAME» превышал этот показатель на 32% и 19% соответственно, по сравнению с группой «Здоровые». Полученные данные свидетельствовали о наличии МС и дисфункции эндотелия в организме крыс, которым в дальнейшем проводили терапию пептидами.

Вторая серия экспериментов. Влияние пептидов KKRRPGP, KRRKPGP на параметры гемостаза, липидного профиля, уровень глюкозы крови и мас-

су тела после их многократного интраназального введения при дисфункции эндотелия (введение L-NAME) на фоне МС. На 56-е сут эксперимента через 20 ч после 7-го введения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP у крыс групп «МС + L-NAME + KKRRPGP» и «МС + L-NAME + KRRKPGP» в плазме крови повышался фибринолиз: СФА – на 87% и 113% соответственно, ФДПА – на 94% и 110%, ФФ – на 58%, активность ТАП – на 16% и 57%, активность плазмينا – на 57% и 151%, а ВЛЭС сокращалось на 15% и 42% по сравнению с «МС + L-NAME» (положительный контроль). Максимальным эффектом обладал препарат KRRKPGP. Одновременно применение указанных пептидов вызывало снижение концентрации фибриногена и активности фактора XIIIa на 29% и 18% соответственно, относительно «МС + L-NAME». Также отмечено наличие у KKRRPGP и KRRKPGP антифибриностабилизирующего действия, т.е. снижение активности фактора XIIIa на 40% и 38% относительно контроля (табл. 2).

При этом интраназальное введение и KKRRPGP, и KRRKPGP приводило к изменению показателей липидного профиля. Так, через 20 ч после последнего введения пептидов в крови животных выявлено достоверное снижение концентрации общего холестерина (на 23–26%), Хс-ЛПНП – на 59% (KKRRPGP) и 66% (KRRKPGP), триглицеридов – на 52% (KKRRPGP) и 63% (KRRKPGP), а также повышение Хс-ЛПВП на

21% (KKRRPGP) и 46% (KRRKPGP) относительно контроля.

Следует отметить, что у животных после введения обоих пептидов параметры гемостаза (АЧТВ, активность фактора XIIIa, СФА, ФДПА, ФФ, ВЛЭС) и липидного профиля (ОХ и Хс-ЛПВП) были близки к значениям, наблюдаемым у здоровых крыс.

На 63-е сут эксперимента, т.е. через 7 сут (168 ч) после прекращения применения пептидов на фоне продолжающейся ВКД в группах «МС + L-NAME + KKRRPGP» и «МС + L-NAME + KRRKPGP» сохранялась повышенная фибринолитическая активность плазмы крови животных. Так, СФА на 38% (KKRRPGP) и 48% (KRRKPGP) превышала значение этого показателя в контроле ($22,5 \pm 0,7$ мм²), ФДПА была выше на 24% и 56% соответственно ($15,2 \pm 0,9$ мм² в контроле); ФФ – на 55% и 81% ($7,4 \pm 0,9$ мм² в контроле); активность плазмينا – на 296% (KRRKPGP) по сравнению с контролем «МС+L-NAME» ($9,5 \pm 1,0$ мм² в контроле). Также выявлено снижение активности фактора XIIIa – на 36% (KKRRPGP) и 26% (KRRKPGP) относительно контрольных значений ($95 \pm 5,0$ усл.ед.) и достоверное падение агрегации тромбоцитов под влиянием пептида KRRKPGP на 27% по сравнению с группой «МС+L-NAME» ($2,2 \pm 0,3$ усл.ед.). В этот период времени концентрация Хс-ЛПНП в крови животных сохраняла пониженные значения и составляла 53% (KKRRPGP) и 56% (KRRKPGP) относительно

Таблица 1

Изменение параметров гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы и прироста массы тела через 20 ч после 5-кратного внутрибрюшинного введения крысам L-NAME (10 мг/кг) на фоне развития МС (M ± m)

| Параметры | Здоровые крысы (контроль) | МС | МС + L-NAME |
|---|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| АТ, индекс | 2,03 ± 0,8 | 2,3 ± 0,4 | 3,2 ± 0,6 ^{##,*} |
| АЧТВ, с | 31,5 ± 3,7 | 27,9 ± 2,2 [#] | 22,3 ± 1,2 ^{##,*} |
| Тромбиновое время, с | 18,4 ± 0,8 | 16,8 ± 0,9 [#] | 17,1 ± 1,1 [#] |
| СФА, мм ² | 36,0 ± 0,9 | 23,0 ± 0,5 ^{##} | 18,1 ± 0,9 ^{##,*} |
| ФДПА, мм ² | 23,0 ± 0,3 | 13,8 ± 0,5 ^{##} | 9,7 ± 0,6 ^{##,**} |
| ФФ, мм ² | 16,0 ± 1,1 | 9,3 ± 0,9 ^{##} | 6,8 ± 0,7 ^{##,**} |
| Активность ТАП, мм ² | 42,0 ± 10,6 | 30,2 ± 4,0 | 28,4 ± 0,9 [#] |
| ВЛЭС, мин | 62,3 ± 2,3 | 114,6 ± 11,3 ^{##} | 92,4 ± 2,2 ^{##,*} |
| Активность плазмينا, мм ² | 38,0 ± 3,5 | 38,8 ± 2,7 | 35,4 ± 4,3 |
| Фактор XIIIa, усл.ед./мл | 71,7 ± 5,1 | 86,0 ± 1,9 [#] | 97,5 ± 2,4 ^{##,*} |
| Концентрация фибриногена, г/л | 3,8 ± 0,4 | 5,7 ± 0,2 ^{##} | 4,5 ± 0,2 ^{##,*} |
| Уровень глюкозы, ммоль/л | 3,9 ± 0,3 | 5,5 ± 0,45 [#] | 6,9 ± 0,5 ^{##,**} |
| Общий холестерин, ммоль/л | 1,939 ± 0,184 | 2,542 ± 0,175 [#] | 2,601 ± 0,214 ^{##} |
| Хс-ЛПВП, ммоль/л | 1,204 ± 0,184 | 0,989 ± 0,076 [#] | 0,891 ± 0,089 [#] |
| Хс-ЛПНП, ммоль/л | 0,735 ± 0,038 | 1,582 ± 0,193 ^{##} | 1,651 ± 0,129 ^{##} |
| Триглицериды, ммоль/л | 0,375 ± 0,075 | 1,409 ± 0,119 ^{##} | 1,383 ± 0,116 ^{##} |
| Прирост массы тела за время введения L-NAME (с 43 по 48-е сут), г | 4,8 ± 0,57 | 6,33 ± 0,49 ^{##} | 5,71 ± 0,56 ^{##,*} |

Примечание: # p < 0,05, ## p < 0,01 – статистическая значимость различий по сравнению с контролем («Здоровые крысы»); * p < 0,05, ** p < 0,1 – статистическая значимость различий между группами «МС» и «МС + L-NAME»; М – среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Обозначения: АТ – агрегация тромбоцитов, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, СФА – суммарная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ФФ – ферментативный фибринолиз, ТАП – тканевой активатор плазминогена, ВЛЭС – время лизиса эуглобулинов, Хс-ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности, Хс-ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности

контроля ($0,854 \pm 0,046$ ммоль/л). Отмечено дальнейшее уменьшение концентрации триглицеридов до 35% (KKRRPGP) и до 31% (KRRKPGP) относительно «МС+L-NAME» ($1,449 \pm 0,128$ ммоль/л). При этом после отмены применения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP параметры гемостаза и липидного обмена приближались, хотя и в разной степени, к значениям, соответствующим таковым у здоровых животных.

Учитывая, что развитие МС сопровождается гипергликемией, определение концентрации глюкозы в крови животных с данной патологией после введения исследуемых пептидов представляет особый интерес. Из применяемых препаратов максимальный гипогликемический эффект был обнаружен после введения KRRKPGP (66% относительно группы «МС+L-NAME» через 20 ч после последнего введения пептида и 88% – через неделю после его отмены на фоне продолжающейся ВКД), в то время как пептид KKRRPGP слабо влиял на изменение уровня глюкозы (табл. 2).

Наблюдая в течение эксперимента изменение массы тела крыс, мы установили, что через 20 ч после последнего введения пептидов (56-е сут) или прирост массы тела с 48-х по 56-е сут эксперимента не наблюдался (KRRKPGP), или крысы даже худели (KKRRPGP) (табл. 2). За 7 сут после отмены применения пептидов (63-е сут) прирост массы тела в группах «МС+L-NAME + KKRRPGP» и «МС+L-NAME + KRRKPGP» составил $-4,0 \pm 0,5$ г и $-9,2 \pm 1,2$ г (животные худели), в группе «Здоровые» – $+4,0 \pm 0,4$ г, а животные

контрольной группы «МС+L-NAME» поправились на $9,8 \pm 2,1$ г.

При МС возникает абдоминальное ожирение в сочетании с повышенным уровнем глюкозы натощак, ИР, повышенным кровяным давлением и липидами плазмы [1–3, 5]. Это ключевые факторы риска развития сахарного диабета 2-го типа, а также сердечно-сосудистых осложнений и смертности. Установлено, что дисфункция эндотелия, повышение активности тромбоцитов и ИР служат причиной хронического метаболического воспаления [16]. При этом отмечают снижение продукции NO и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации [17]. Это объясняется гиперактивацией β -адренорецепторов клеток эндотелия, что приводит к усилению синтеза медиаторов воспаления, нарушению трансдукции инсулинового сигнала через путь PI3K-Akt и уменьшению активации эндотелиальной синтазы eNOS [18, 19]. Также показано, что длительное воздействие на клетки эндотелия высоких уровней глюкозы индуцирует клеточную дисфункцию [4], производство CCR5 и его лигандов [20].

Ранее нами было показано, что у животных с экспериментальным МС наблюдается уменьшение уровня метаболитов (нитратов и нитритов) синтеза NO, что свидетельствует об угнетении функции эндотелия [21]. В настоящей работе введение крысам с МС препарата L-NAME (широко используемого ингибитора eNOS [22]) приводило к усугублению гиперкоагуляции, проявляющейся значительным возрастанием агрегации тромбоци-

Таблица 2

Изменение параметров гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы и прироста массы тела крыс через 20 ч после 7-кратного интраназального введения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP в ежедневной дозе 100 мкг/кг на фоне дисфункции эндотелия (введение L-NAME) при развитии метаболического синдрома (M \pm m)

| Параметры | Здоровые крысы | МС+ L-NAME (Контроль) | МС+ L-NAME + KKRRPGP | МС+ L-NAME + KRRKPGP |
|---|------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| АТ, индекс | $1,6 \pm 0,2^*$ | $2,1 \pm 0,5$ | $1,9 \pm 0,5^{\#}$ | $2,1 \pm 0,2^{\#}$ |
| АЧТВ, с | $39,8 \pm 3,2^*$ | $36,7 \pm 1,2$ | $39,8 \pm 0,6$ | $38,7 \pm 2,5$ |
| Тромбиновое время, с | $24,1 \pm 2,1^*$ | $19,4 \pm 0,1$ | $26,2 \pm 0,9^*$ | $28,0 \pm 0,6^{**}$ |
| СФА, мм ² | $36,0 \pm 0,7^{**}$ | $19,6 \pm 1,0$ | $36,6 \pm 0,1^{**}$ | $41,8 \pm 0,9^{**}$ |
| ФДПА, мм ² | $22,6 \pm 0,7^{**}$ | $10,4 \pm 0,9$ | $22,0 \pm 0,7^{**}$ | $20,6 \pm 0,7^{**}$ |
| ФФ, мм ² | $13,3 \pm 0,9^*$ | $9,2 \pm 1,0$ | $14,6 \pm 0,9^{**}$ | $14,6 \pm 0,9^{**}$ |
| Активность ТАП, мм ² | $55,8 \pm 5,3^{**}$ | $25,0 \pm 1,2$ | $29,0 \pm 1,1^*$ | $39,2 \pm 1,1^{**}$ |
| ВЛЭС, мин | $58,0 \pm 9,2^{**}$ | $106,0 \pm 6,9$ | $90,5 \pm 7,6$ | $61,6 \pm 5,0^*$ |
| Активность плазмينا, (мм ²) | $33,0 \pm 2,1^{**}$ | $7,0 \pm 1,2$ | $11,0 \pm 1,1^*$ | $17,6 \pm 1,6^{**}$ |
| Фактор XIIIa, усл.ед./мл | $65,0 \pm 2,9^{**}$ | $112,4 \pm 4,0$ | $67,2 \pm 2,7^{**}$ | $70,0 \pm 7,2^{**}$ |
| Концентрация фибриногена, г/л | $3,5 \pm 0,2^{**}$ | $5,75 \pm 0,2$ | $4,1 \pm 0,7^*$ | $4,7 \pm 0,3^{**}$ |
| Уровень глюкозы, ммоль/л | $3,7 \pm 0,2^{**}$ | $6,8 \pm 0,3$ | $5,9 \pm 0,5$ | $4,5 \pm 0,7^{**}$ |
| Общий холестерин, ммоль/л | $1,191 \pm 0,041^{**}$ | $1,593 \pm 0,093$ | $1,180 \pm 0,048^{**}$ | $1,231 \pm 0,045^{**}$ |
| Хс-ЛПВП, ммоль/л | $0,759 \pm 0,026^*$ | $0,659 \pm 0,035$ | $0,798 \pm 0,033^*$ | $0,963 \pm 0,033^{**}$ |
| Хс-ЛПНП, ммоль/л | $0,454 \pm 0,022^*$ | $0,935 \pm 0,205$ | $0,382 \pm 0,042^*$ | $0,319 \pm 0,048^*$ |
| Триглицериды, ммоль/л | $0,515 \pm 0,072^{**}$ | $1,622 \pm 0,159$ | $0,777 \pm 0,073^{**}$ | $0,604 \pm 0,037^{**}$ |
| Прирост массы тела за время введения пептидов (с 48 по 56-е сут), г | $6,2 \pm 0,49^*$ | $7,2 \pm 0,86$ | $-1,5 \pm 1,45^{**}$ | $0,17 \pm 0,97^{**}$ |

Примечание: # $p < 0,05$, ## $p < 0,1$ – статистическая значимость различий по сравнению с группой «Здоровые»; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – статистическая значимость различий по сравнению с группой «МС + L-NAME».

Обозначения: см. табл. 1.

тов и ослаблением антикоагулянтно-фибринолитического потенциала крови.

Нами впервые показано, что на фоне развития метаболических нарушений, сочетающихся с дисфункцией эндотелия, многократное интраназальное введение аргинин- и лизинсодержащих пептидов животным восстанавливает нарушенные функции эндотелия, гемостатической системы, липидного и углеводного обмена. Об этом свидетельствовало повышение в крови активности ТАП, выделяющегося из эндотелия под влиянием исследуемых пептидов. При этом отмечалась активация функции противосвертывающей системы, на что указывало повышение антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови. ФДПА (или неферментативная фибринолитическая) активность плазмы животных характеризует ее способность предотвращать процессы начинающегося фибрино- или тромбообразования. Это можно объяснить присутствием в пептидах аминокислоты лизин, которая, облегчая фибринолитические процессы в кровотоке, способствует нормальному кровоснабжению тканей [23]. В более ранних работах с пептидными препаратами был установлен антифибриностабилизирующий эффект коротких пролинсодержащих пептидов (Pro-Gly, Pro-Gly-Pro), т.е. подавление полимеризации фибрина [14, 24]. Исследуемые нами более сложные пептиды глипролинового ряда, содержащие в своей структуре аргинин и лизин, также снижают уровень свертывающих факторов крови – фактора XIIIa, фибриногена и тромбина. Кроме того, они положительно влияют на углеводный обмен, снижая уровень глюкозы крови, и на липидный обмен, снижая концентрацию преатерогенного Хс-ЛПНП и триглицеридов, поэтому у таких крыс не только не наблюдалось ожирения, как это было у животных с МС, а напротив, масса тела снижалась к концу эксперимента даже при потреблении крысами высококалорийного корма. Ранее нами было показано, что интраназальное введение аргининсодержащего пептида PGPR приводит к ослаблению резистентности к инсулину при гипергликемии [25]. Возможно, исследованные пептиды KKRRPGP и KRRKPGP также способствуют уменьшению ИР и увеличению активности липопротеидной липазы крови, снижению атерогенных свойств крови и восстановлению уровня глюкозы до значений, соответствующих норме, поскольку подобные эффекты установлены для других глипролинов [26].

На основании проведенного исследования можно заключить, что лизинсодержащие пептиды

при многократном ежедневном интраназальном введении в дозе 100 мкг/кг животным с дисфункцией эндотелия на фоне МС оказывают противосвертывающий, гипогликемический, гиполипидемический эффекты и снижают прирост массы тела. Пептиды влияют как на первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, снижая агрегацию тромбоцитов, так и на все звенья плазменного гемостаза, повышая антикоагулянтную, фибриндеполимеризационную и ферментативную фибринолитическую активность, а также антифибриностабилизирующие свойства плазмы и снижают в ней концентрацию фибриногена. Одновременно с этим исследуемые пептиды уменьшают содержание общего холестерина, Хс-ЛПНП, триглицеридов и увеличивают концентрацию Хс-ЛПВП. Эти эффекты проявляются через 20 ч после последнего введения пептидов и сохраняются, хотя и в меньшей степени, и через 7 сут после отмены их введения, поэтому можно говорить о длительности действия в организме обоих пептидов глипролинового ряда, включающих в свою структуру лизиновые остатки, и об их способности защищать организм от развития МС и дисфункции эндотелия. Максимальный эффект вызывает пептид KRRKPGP, что, возможно, обусловлено местонахождением аминокислотных остатков аргинина между двумя остатками лизина. В результате протеолиза исследуемых в данной работе пептидов могут образовываться разные дериваты – короткие пептиды и аминокислоты, обладающие разной биологической активностью. Возможно, в результате биodeградации KRRKPGP повышается биодоступность аргинина, входящего в состав этой молекулы.

Таким образом, оба препарата регуляторных пептидов в перспективе могут оказать положительное корректирующее действие при развитии предтромбозов, дисфункции эндотелия, нарушенного обмена веществ в организме.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № АААА-А16-16021660094-0 «Физиологические регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии» на базе ФГБУ Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом Института молекулярной генетики РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome // Clin. Dermatol. 2018. Vol. 36. N 1. P. 14–20.

2. Lee S.K., Khambhati J., Bhagava A., Engels M.C., Sandesara P.B., Quyyumi A.A. Endothelial dysfunction and metabolic syndrome // Hypertens. J. 2017. Vol. 3. N 2. P. 72–80.

3. Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R. Obesity induces a phenotypic switch in the polarization of adipose tissue macrophages // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol. 117. N 1. P. 175–184.
4. Brownlee M. Pathobiology of diabetic complications: unifying mechanism // *Diabetes.* 2005. Vol. 54. N 6. P. 1615–1625.
5. Kitade H., Sawamoto K., Nagashimada M., Inoue H., Yamamoto Y., Sai Y. CCR5 plays an important role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance, regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status // *Diabetes.* 2012. Vol. 61. N 7. P. 1680–1690.
6. Forbes J.M., Cooper M.E. Mechanisms of diabetic complications // *Physiol. Rev.* 2013. Vol. 93. N 1. P. 137–188.
7. Beverly J.K., Budoff M.J. Atherosclerosis: pathophysiology of insulin resistance, hyperglycemia, hyperlipidemia, and inflammation // *J. Diabetes.* 2020. Vol. 12. N 2. P. 102–104.
8. Zhang Z., Liu J., Wang H., Wu H., Wu X., Dong J., Liao L. Association between a variant of the chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 gene and atherosclerosis: meta analysis of 13 studies // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8. N 1. P. 658–665.
9. Pothineni N.V.K., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi L.F., Romeo F., Shah P.K., Mehta J.L. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease // *Eur. Heart J.* 2017. Vol. 38. N 43. P. 3195–3201.
10. Gresele P., Momi S. Nitric oxide-enhancing or – releasing agents as antithrombotic drugs // *Biochem. Pharmacol.* 2019. Vol. 166. P. 300–312.
11. Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Kigiyama K., Yasue H., Ogawa H. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: on possible role of oxidative stress // *Atherosclerosis.* 2002. Vol. 161. N 2. P. 375–380.
12. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Andreeva L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. The modern view on the role of glyprolines by metabolic syndrome // *Med. Res. Rev.* 2020. DOI: 10.1002/med.21748.
13. Tian D.L., Guo R.J., Li Y.M., Chen P.P., Zi B.B., Wang J.J., Liu R.F., Min Y.N., Wang Z.P., Niu Z.Y., Liu F.Z. Effects of lysine deficiency or excess on growth and the expression of lipid metabolism genes in slow-growing broilers // *Poultry Sci.* 2019. Vol. 98. N 7. P. 2927–2932.
14. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia // *Pathophysiol.* 2016. Vol. 23. N 1. P. 27–33.
15. Ляпина Л. А., Григорьева М. Е., Оберган Т. Ю., Шубина Т. А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: *Авансед Солюшнз*, 2012. 160 с.
16. Yao L., Herlea-Pana O., Heuser-Baker J., Chen Y., Barlic-Dicen J. Roles of the chemokine system in the development of obesity, insulin resistance and cardiovascular disease // *J. Immunol. Res.* 2014. Vol. 2014: 181450.
17. Grandi G., Wolfrum C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome // *Semin. Immunopathol.* 2018. Vol. 40. N 2. P. 215–224.
18. Davel A.P., Wenceslau C.F., Akamine E.H., Xavier F.E., Couto G.K., Oliveira H.T., Rossoni L.V. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2011. Vol. 44. N 9. P. 920–932.
19. Rask-Madsen C., King G.L. Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 3. N 1. P. 46–56.
20. Li G., Zhu G., Gao Y., Xiao W., Xu H., Liu S. Neferin inhibits upregulation of CCL5 and CCR5 in vascular endothelial cells during chronic high glucose processing // *Inflammation.* 2013. Vol. 36. N 2. P. 300–308.
21. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю. Регуляция глипролинами первичного гемостаза и сосудисто-эндотелиальной функции организма при метаболическом синдроме // *Тромбоз, гемостаз и реол.* 2019. № 3. С. 32–37.
22. Kopicová J., Púžserová A., Bernátová I. L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? // *Pharmacol. Rep.* 2012. Vol. 64. N 3. P. 511–520.
23. Grandl G., Wolfrum C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome // *Semin. Immunopathol.* 2018. Vol. 40. N 2. P. 215–224.
24. Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Grigor'eva M.E., Shubina T.A., Andreeva L.A. The modern conception of the regulatory role of peptides of the glyproline family in the correction of hemostasis system function during development of diabetes mellitus // *Biol. Bull.* 2013. Vol. 40. N 2. P. 381–393.
25. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е., Мясоедов Н.Ф., Ульянов А.М. Защитные эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Arg в условиях повышенной свертываемости крови при экспериментальной гипергликемии // *Тромбоз, гемостаз и реол.* 2011. № 3. С. 41–46.
26. Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Tanashyan M.M., Susina Z.A., Lyapina L.A., Rochev D.L. *In vitro* lipid-lowering and fibrinolytic effects of regulatory leucine-containing glyprolines in human blood // *Biol. Bull.* 2015. Vol. 42. N 1. P. 74–77.

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 15.01.2021 г.

Принята в печать 22.01.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effects of KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) and KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) peptides on hemostasis parameters, lipid profile, blood glucose level, and body weight changes in rats with metabolic syndrome and endothelial dysfunction

N.F. Myasoedov¹, L.A. Lyapina² , T.Y. Obergan^{2,*} , M.E. Grigorjeva² ,
T.A. Shubina² , L.A. Andreeva¹

¹Institute of Molecular Genetics Russian Academy of Sciences, Kurchatov sq. 2, Moscow, 123182, Russia;

²Laboratory of Blood Protection Systems, Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: tobergan@mail.ru

Lysine- and arginine-containing peptides Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro and Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro were administered intranasal way (daily single dose of 100 mcg/kg for 7 days) to animals (laboratory rats) with experimental metabolic syndrome and endothelial dysfunction. Metabolic syndrome was modeled by a high-calorie diet throughout the experiment period, and endothelial dysfunction was modeled by intraperitoneal injection of L-NAME (daily single dose of 10 mg/kg for 5 days). It was found that these peptides had anti-clotting, hypoglycemic, and hypocholesterol effects and reduced body weight gain in experimental animals. Peptides treatments affected both primary (vascular-platelet) hemostasis, reducing platelet aggregation, and all links of plasma hemostasis, increasing anticoagulant, fibrindepolymerization and enzymatic fibrinolytic activity, as well as antifibrinolytic properties of plasma and reducing the concentration of fibrinogen in it. At the same time, the studied peptides reduced the content of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides, increasing the concentration of high-density lipoprotein cholesterol. These effects were observed 20 hrs after the last administration of peptides and persisted, although to a lesser extent, 7 days (168 hrs) after stopping treatment. In this regard, we can talk about the prolonged action of both glyproline peptides, which have lysine and arginine amino acid residues in their structure, and their ability to protect the body from the development of metabolic diseases and endothelial dysfunction. The maximum effects were provided by the Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptide, which may be due to its structural features.

Keywords: metabolic syndrome, lysine- and arginine-containing peptides, endothelial dysfunction, body weight, glucose level, lipid profile, hemostasis system

Funding: This study was performed under the state assignment of Institute of Molecular Genetics, National Research Centre “Kurchatov Institute”, project number AAAA-A16-16021660094-0.

Сведения об авторах

Мясоедов Николай Федорович – академик РАН, докт. хим. наук, зам. директора Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-00-02; e-mail: *nfm@img.ras.ru*

Ляпина Людмила Анисимовна – докт. биол. наук, гл. научн. сотр., проф., зав. лабораторией защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: *lyapinal@mail.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Оберган Тамара Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-14-11; e-mail: *tobergan@mail.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Григорьева Марина Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-26-08. e-mail: *mgrigorjeva@mail.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Шубина Татьяна Александровна – канд. биол. наук, ст. научн. сотр., лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-14-11. e-mail: *shubina-74@mail.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1092-8382>

Андреева Людмила Александровна – рук. сектора Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-16-02; e-mail: *landr@img.ras.ru*

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.24

Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха**Д.Б. Киселевский^{1,*} , Б.Ц. Шагдарова², В.П. Варламов², О.В. Самуилова³, В.Д. Самуилов¹**

¹Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²лаборатория инженерии биополимеров, Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российская академия наук, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2;

³кафедра биохимии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
*e-mail: dkiselevs@mail.ru

Испытано действие на клетки эпидермиса из листьев гороха низкомолекулярных хитозанов с молекулярной массой 5, 6, 10, 25, 45 кДа и степенью деацетилирования (СД) 85–99%, полученных при помощи химической деполимеризации и ферментативного гидролиза. Низкомолекулярный хитозан вызывал модификацию плазматической мембраны устьичных клеток, регистрируемую по изменению ее проницаемости для флуоресцирующего красителя йодида пропидия, и программируемую гибель эпидермальных клеток, определяемую по разрушению клеточных ядер. Эти эффекты были сходны с действием коммерческого высокомолекулярного хитозана с молекулярной массой 290 кДа (СД 90%), проявлявшимся в более высоких концентрациях, чем в случае низкомолекулярного хитозана. Губительное действие хитозана на клетки зависело в большей степени от СД и не проявлялось в концентрациях до 10 мкг/мл включительно. Низкомолекулярный хитозан усиливал образование активных форм кислорода в эпидермисе, детектируемое по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Антиоксиданты нитросиний тетразолий и пропилгаллат замедляли, а H₂O₂ стимулировал этот процесс.

Ключевые слова: программируемая клеточная смерть, плазматическая мембрана, хитозан, эпидермис, йодид пропидия, горох

Хитозан – линейный полисахарид, состоящий из остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, соединенных β-1,4-гликозидными связями. Его получают из хитина, основного структурного компонента покровов членистоногих и клеточных стенок грибов, путем частичного или полного деацетилирования [1–6]. Благодаря свободным аминогруппам в остатках глюкозамина хитозан является поликатионом в кислых средах. Это компонент клеточной стенки некоторых грибов [1, 3–5, 7]. Хитозан и его производные проявляют антибактериальную, антиоксидантную, иммуномодулирующую и противоопухолевую активность, биосовместимы (нетоксичны, слабоиммуногенны) и биоразлагаемы. Они применимы в составе пленок для упаковки и консервирования пищевых продуктов как пищевые добавки, как компонент фильтров для очистки воды, в косметике, в текстильной промышленности, при создании лекарственных форм, в составе ранозаживляющих перевязочных материалов, в сельском хозяйстве для защиты семян и повышения урожайности [6, 8].

Хитозан способен вызывать приток Ca²⁺ в цитоплазму клеток растений, влиять на митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК, *mitogen-activated protein kinase*), на экспрессию связанных с патогенезом генов *PR* (*pathogenesis-related*), образование каллозы (β-1,3-глюкана) в качестве изолирующего материала в ответ на поранение клетки, вызывать накопление фитоалексинов, синтез фитогормонов, повреждение ДНК, изменения хроматина, образование активных форм кислорода (АФК) и иммунный (гиперчувствительный) ответ, сопровождающийся локальной гибелью клеток [3]. Хитозан обладает противовирусным действием: уменьшает некротические повреждения листьев растений, вызванные вирусами, в том числе вирусом табачной мозаики [3, 9]. Хитозан и его производные подавляют рост фитопатогенных грибов и бактерий [5, 6]. Обработка хитозаном перспективна для увеличения срока хранения овощей и фруктов, их защиты от гнили и плесени [1, 3].

Хитин относится к элиситорам, способным инициировать иммунный ответ у растений. Ре-

цепторы, связывающие хитин, не пригодны для распознавания хитозана [3]. Поиск белков на поверхности клеток листьев пшеницы, способных взаимодействовать с хитозаном, выявил несколько возможных рецепторов хитозана: они связывают хитозан, расположены в плазматической мембране и обладают киназной активностью [10].

Чтобы проникнуть в клетки, многие фитопатогены используют устьица на поверхности листьев растений. Обработка эпидермиса гороха хитозаном в концентрации 5 мкг/мл и выше вызывала закрытие устьиц, которое сопровождалось образованием АФК и NO [11]. Олигосахариды на основе хитина и хитозана (октамеры из остатков N-ацетилглюкозамина и глюкозамина соответственно) обладали различным действием на замыкающие клетки устьиц (устьичные клетки) *Arabidopsis thaliana*. Хитиновый олигосахарид индуцировал закрытие устьиц, а хитозановый октамер не вызывал закрытия устьиц, но в более высоких концентрациях (от 60 мкМ или ~80 мкг/мл) индуцировал гибель устьичных клеток [12].

Хитозан вызывал программируемую клеточную смерть (ПКС) основных клеток эпидермиса (эпидермальных клеток) листьев гороха. ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер. Зависимому от хитозана распаду ядер эпидермальных клеток предшествовали конденсация, маргинация хроматина и межнуклеосомная фрагментация ДНК. Хитозан не приводил к разрушению ядер устьичных клеток [13]. Анаэробии и антиоксиданты, в том числе митохондриально-направленные антиоксиданты (SkQ), подавляли действие хитозана на ядра эпидермальных клеток [13, 14]. Хитозан-индуцированное разрушение ядер эпидермальных клеток листьев гороха чувствительно к ингибиторам альтернативной оксидазы митохондрий, NADPH-оксидазы плазматической мембраны, синтеза белка и аутофагии [13]. Хитозан увеличивал активность протеинкиназы в клетках эпидермиса листьев и стимулировал образование АФК в устьичных клетках. При увеличении концентрации хитозана прекращалось разрушение клеточных ядер, но наблюдалось повреждение плазматической мембраны, определяемое по проникновению в клетки красителя йодида пропидия (PI) [15, 16].

Хитозан плохо растворим в воде. Для повышения растворимости его подвергают деполимеризации, получая низкомолекулярный хитозан [2, 4].

Целью настоящей работы являлись исследование действия низкомолекулярного хитозана на клетки растений и сравнение его с действием высокомолекулярного хитозана. Объект исследования — эпидермис из листьев гороха, монослой клеток, удобный для обработки клеток реагентами и микроскопии.

Материалы и методы

Образцы низкомолекулярного хитозана получали с использованием химической деполимеризации и ферментативного гидролиза. При химической деполимеризации высокомолекулярного хитозана использовали соляную кислоту. Для этого хитозан ресуспендировали в 6 М соляной кислоте при перемешивании (3 ч, 90°C). Выход составлял 45–50% [2]. Для ферментативного гидролиза высокомолекулярного хитозана использовали ферментный комплекс, продуцируемый *Myceliophthora* sp. Для получения различных молекулярных масс (ММ) использовали различные соотношения фермент–субстрат. Реакцию проводили при pH 5,4–5,6, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 15 мин. Выход образцов хитозана в зависимости от ММ составлял 50–80%. [17]. Полученные хитозаны были охарактеризованы с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ММ) и протонного магнитного резонанса (степень деацетилирования — СД). Свойства низкомолекулярного хитозана и коммерческого хитозана «Fluka» (Германия) с высокой ММ приведены в таблице.

Таблица

Свойства полученных образцов хитозана и хитозана фирмы «Fluka»

| Хитозан | Средневесовая молекулярная масса, кДа | Степень деацетилирования, % |
|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| низкомолекулярный | 5 | 85 |
| низкомолекулярный | 6 | 98–99 |
| низкомолекулярный | 10 | 85 |
| низкомолекулярный | 25 | 98–99 |
| низкомолекулярный | 45 | 98–99 |
| высокомолекулярный, «Fluka» | 290 | 90 |

Опыты проводили на пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев 11–19-суточных проростков гороха *Pisum sativum* L. сорта Альфа. Эпидермис представляет собой монослой из клеток двух типов: устьичных и эпидермальных. Эпидермальные клетки являются частью симпласта листа — они соединены между собой и с клетками мезофилла плазмодесмами. Устьичные клетки изолированы — плазмодесмы связывают только две соседние клетки устьица [18]. Растения выращивали в условиях периодического освещения (свет/темнота — 16/8 ч) металлогалогеновой лампой ДРiЗ Reflux, 250 Вт, с интенсивностью 70–100 мкЕ/(м²с) при 22–28°C. Пленки эпидермиса отделяли от нижней поверхности листьев пинцетом, помещали в бидистиллированную воду (50 мл), добавляли хитозан (концентрация отмечена на рисунках или в подписях к ним) и инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке (400 об./мин), а затем без перемешивания в темноте 2 ч (с последующим определением проницаемости плазматической

мембраны) или 22–24 ч (после чего оценивали разрушение клеточных ядер). Условия экспериментов представлены в подписях к рисункам.

Проницаемость плазматической мембраны клеток определяли с помощью флуоресцирующего красителя PI, связывающегося с ДНК клеточных ядер и не проникающего через нативную мембрану [19]. Пленки эпидермиса окрашивали 20 мин посредством 2 мкМ PI. Наблюдения проводили на флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия). Флуоресценцию PI возбуждали светом 525–565 нм и регистрировали при 575–640 нм. Определяли долю клеток, в ядрах которых флуоресцирует PI, т.е. с проницаемой для PI плазматической мембраной.

ПКС регистрировали по разрушению клеточных ядер [20]. Эпидермис обрабатывали 5 мин фиксатором Батталья (смесь хлороформа, 96%-ного этанола, ледяной уксусной кислоты и 40%-ного формалина в соотношении 5:5:1:1), промывали 10 мин этанолом и 5 мин водой для удаления фиксатора, окрашивали 40 мин гематоксилином Карацци. Окрашенные пленки эпидермиса промывали водопроводной водой и исследовали с помощью световой микроскопии. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами, а также клеток, лишенных ядер.

В каждом варианте эксперимента исследовали 300–650 клеток в 2–3 пленках эпидермиса. Эксперименты повторяли 2–3 раза. Приводятся данные типичных экспериментов, указаны средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

АФК в клетках детектировали по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) [21]. Пленку эпидермиса, закрепленную на пластиковой пластинке с помощью силиконового геля, помещали в кювету с 2 мл среды инкубации, содержащей 50 мМ трицин-КОН, pH 7,8, с 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂. В кювету последовательно добавляли нефлуоресцирующий диацетат 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCFH-DA) и другие реагенты. DCFH-DA проникает в клетки через плазматическую мембрану, деацетируется внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, преимущественно H₂O₂ с участием пероксидаз, превращаясь в флуоресцирующий DCF. В образование DCF могут быть вовлечены ионы металлов переменной валентности и цитохром c, обладающий активностью, сходной с пероксидазной [22]. Флуоресценцию DCF измеряли на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad, США), возбуждая ее светом 485–495 нм и регистрируя при 515–525 нм.

Результаты и обсуждение

С использованием ферментативного гидролиза получены образцы хитозана с ММ 5 и 10 кДа и СД 85%. Химической деполимеризацией получены хитозаны с ММ 6, 25, 45 кДа и СД 98–99% (таблица). Испытано действие этих препаратов на

клетки эпидермиса из листьев гороха. В экспериментах также использовали коммерческий хитозан фирмы «Fluka» с ММ 290 кДа и СД 90%.

Хитозаны в концентрации 0,1 мг/мл с ММ 6, 25 или 45 кДа после инкубации в течение 2,5 ч индуцировали проницаемость плазматической мембраны для PI у всех устьичных клеток (рис. 1). Препараты с ММ 5 или 10 кДа, а также хитозан «Fluka» не обладали подобным действием. Видимо, их эффект зависит не от ММ хитозана, а определяется его СД (таблица). Ни низкомолекулярные хитозаны (5, 6, 10, 25 или 45 кДа), ни высокомолекулярный хитозан «Fluka» не приводили к разрушению ядер устьичных клеток. Хитозан с ММ 5–45 кДа после односуточной инкубации не вызывал ПКС эпидермальных клеток в отличие от коммерческого хитозана «Fluka», который увеличивал долю клеток с разрушенными ядрами (рис. 1).

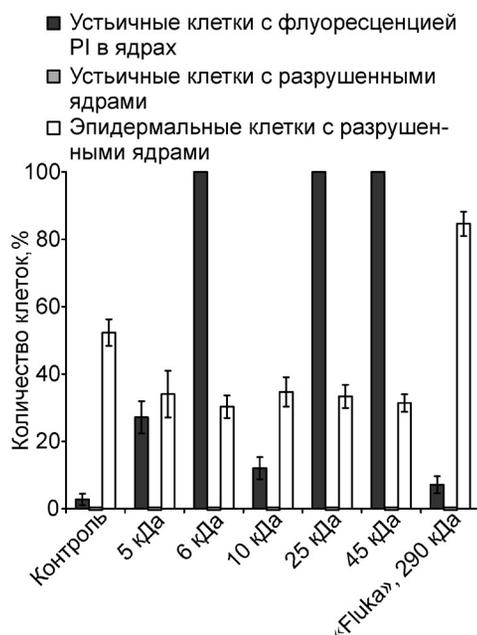


Рис. 1. Действие образцов хитозана на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI и состояние ядер устьичных и эпидермальных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. Пленки эпидермиса в биодистиллированной воде без добавок (контроль) или в суспензии 0,1 мг/мл хитозана инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Затем инкубировали без перемешивания 2 ч, окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах или инкубировали 22 ч и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. На рисунке отмечены молекулярные массы образцов хитозана и вариант с хитозаном фирмы «Fluka». Приведены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

Исследован эффект хитозана с ММ 5 или 6 кДа в более низкой концентрации: 3–30 мкг/мл. Из испытанных вариантов только хитозан 6 кДа в концентрации 30 мкг/мл увеличивал проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI (рис. 2). Разрушение ядер эпидермальных клеток посредством хитозана 5 кДа наблюдалось лишь при концентрации 30 мкг/мл.

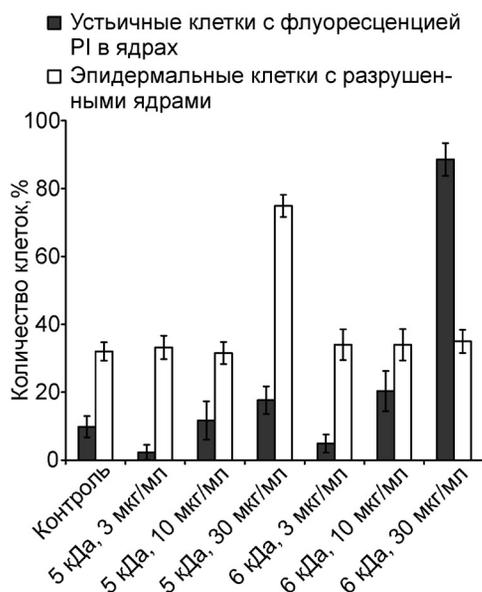


Рис. 2. Действие низкомолекулярных хитозанов на проницаемость плазматической мембраны устьичных клеток для PI и состояние ядер эпидермальных клеток в пленках эпидермиса из листьев гороха. Пленки эпидермиса в бидистиллированной воде без добавок (контроль) или в суспензии хитозана инкубировали 30 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Затем инкубировали без перемешивания 2 ч, окрашивали PI и определяли количество клеток с флуоресценцией PI в клеточных ядрах или инкубировали 24 ч и определяли количество клеток с разрушенными ядрами. На рисунке отмечены молекулярные массы образцов хитозана и их концентрации. Приведены средние значения \pm 95%-ные доверительные интервалы.

Как было показано ранее [16], концентрация хитозана «Fluka», при которой происходило разрушение ядер эпидермальных клеток листьев гороха, составляла 0,1 мг/мл. В более высокой концентрации (1 мг/мл) этот хитозан вызывал изменение плазматической мембраны устьичных клеток, которое приводило к проникновению в клетки красителя PI. Эти данные в сочетании с данными, представленными на рис. 1 и 2, свидетельствуют о том, что испытанные препараты низкомолекулярного хитозана повреждают плазматическую мембрану и разрушают ядра клеток в более низких концентрациях, чем хитозан «Fluka». В диапазоне 3–100 мкг/мл не удалось обнаружить концентрацию, при которой разрушение ядер вызывал бы хитозан 6 кДа.

Повреждение плазматической мембраны клеток, по-видимому, препятствует разрушению ядер при ПКС, поскольку с разными образцами и концентрациями хитозана его разрушительное действие проявлялось либо в увеличении доли клеток с проницаемой для PI плазматической мембраной, либо в повышении числа клеток с разрушенными клеточными ядрами, но не то и другое совместно. Для прохождения PI в клетки достаточно 2 ч инкубации с хитозаном (после 30 мин обработки хитозаном при перемешивании), а для разрушения ядер – более длительный срок. Про-

никновение PI в клетки эпидермиса можно наблюдать, даже если клеточные ядра разрушены [16]. Низкомолекулярный хитозан с ММ 5 или 6 кДа в концентрации 10 мкг/мл и ниже не вызывает гибели клеток и деструктивных изменений клеточной мембраны (рис. 2).

Низкомолекулярный хитозан с ММ 5, 6 или 10 кДа стимулировал образование АФК в эпидермисе листьев гороха: рост флуоресценции DCF, образующегося из нефлуоресцирующего DCFH-DA (рис. 3). Такое же действие на клетки эпидермиса оказывал хитозан «Fluka» [15]. Антиоксиданты нитросиний тетразолий и пропилгаллат снижали скорость роста флуоресценции DCF, а H_2O_2 ускорял ее рост (рис. 3).

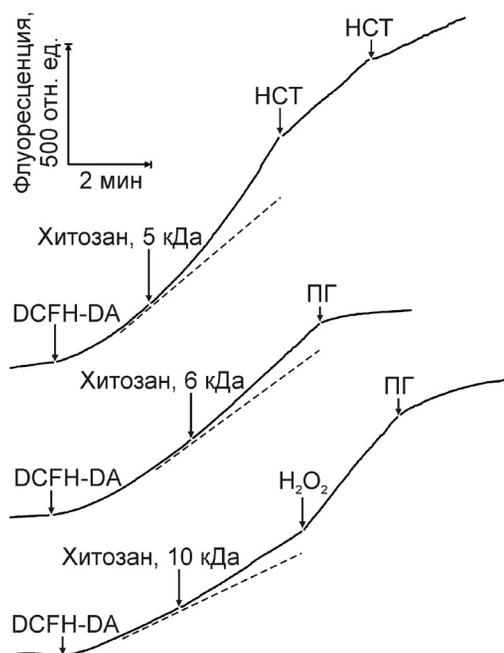


Рис. 3. Действие хитозана на флуоресценцию DCF в пленках эпидермиса из листьев гороха. Добавки: 20 мкМ DCFH-DA, 0,1 мг/мл низкомолекулярного хитозана (молекулярные массы отмечены на рисунке), 0,2 мМ нитросинего тетразолия (НСТ), 1 мМ пропилгаллата (ПГ), 20 мкМ H_2O_2 . Прерывистыми линиями отмечен рост флуоресценции DCF до добавки хитозана.

Генерация АФК – одна из наиболее быстрых реакций клеток растений на хитозан. Время, необходимое на ее проявление в устьичных клетках, составляет не более 5 мин [11]. После этого происходит закрытие устьиц, препятствующее проникновению патогенов. Такая реакция на патогенные грибы может стимулироваться хитиназами растений, которые гидролизуют хитин клеточных стенок гриба до олигомеров, доступных для рецепторов на плазматической мембране клеток растений. Для противодействия этой защите фитопатоген способен применять деацетилазы хитина, трансформирующие хитиновые олигосахариды в хитозановые, которые не только не распознаются хитиновым рецептором, но в высоких концентрациях могут вести к повреждению и гибели устьич-

ных клеток, открывая патогену доступ в лист через устьица [12].

Таким образом, губительное действие хитозана на клетки зависело в большей степени от СД и не наблюдалось в концентрациях до 10 мкг/мл включительно. Низкомолекулярный хитозан с высокой СД (98–99%) индуцировал проницаемость плазматической мембраны для PI у устьичных клеток, действуя в более низкой концентрации, чем высокомолекулярный хитозан «Fluka». Все испытанные образцы низкомолекулярного хитозана в концентрации 0,1 мг/мл не вызывали разрушения ядер эпидермальных клеток, в отличие от коммерческого хитозана. Низкомолекулярный

хитозан (5, 6 или 10 кДа) усиливал образование АФК в эпидермисе.

Работа по получению и анализу низкомолекулярных хитозанов частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-016-00205). Работа выполнена при финансовой поддержке научно-исследовательской работы (НИР) из средств федерального бюджета (регистрационный номер НИР в ЦИТИС: АААА-А16-116021660081-0). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Феофилова Е.П.* Клеточная стенка грибов М.: Наука, 1983. 248 с.
2. *Shagdarova B.T., Il'ina A.V., Varlamov V.P.* Antibacterial activity of alkylated and acylated derivatives of low-molecular weight chitosan // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. Vol. 52. N 2. P. 222–225.
3. *Hadwiger L.A.* Multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype // *Plant Sci.* 2013. Vol. 208. P. 42–49.
4. *Davydova V.N., Yermak I.M.* The conformation of chitosan molecules in aqueous solutions // *Biophysics.* 2018. Vol. 63. N 4. P. 501–511.
5. *Varlamov V.P., Il'ina A.V., Shagdarova B.T., Lunkov A.P., Mysyakina I.S.* Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches // *Biochemistry (Mosc).* 2020. Vol. 85. Suppl. 1. P. S154–S176.
6. *Wang W., Xue C., Mao X.* Chitosan: Structural modification, biological activity and application // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 164. P. 4532–4546.
7. *Young D.H., Köhle H., Kauss H.* Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. N 5. P. 1449–1454.
8. *Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 105. Pt. 2. P. 1358–1368.
9. *Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J.* Induction of antiviral resistance in plants by chitosan // *Plant Sci.* 1991. Vol. 79. N 1. P. 63–68.
10. *Liu D, Jiao S, Cheng G, Li X, Pei Z, Pei Y, Yin H, Du Y.* Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 111. P. 1083–1090.
11. *Srivastava N., Gonugunta V.K., Puli M.R., Raghavendra A.S.* Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum* // *Planta.* 2009. Vol. 229. N 4. P. 757–765.
12. *Ye W., Munemasa S., Shinya T., Wu W., Ma T., Lu J., Kinoshita T., Kaku H., Shibuya N., Murata Y.* Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. Vol. 117. N 34. P. 20932–20942.
13. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Zinovkin R.A., Kiselevsky D.B., Lobysheva N.V., Samuilov V.D.* Chitosan-induced programmed cell death in plants // *Biochemistry (Mosc).* 2009. Vol. 74. N 9. P. 1035–1043.
14. *Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Shestak A.A., Samuilov V.D.* Programmed cell death in plants: protective effect of mitochondrial-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc).* 2011. Vol. 76. N 10. P. 1120–1130.
15. *Kiselevsky D.B., Frolova O.Y., Solovyev A.G., Dorokhov Y.L., Morozov S.Y., Samuilov V.D.* Plant cell death caused by fungal, bacterial, and viral elicitors: protective effect of mitochondria-targeted quinones // *Biochemistry (Mosc).* 2014. Vol. 79. N 12. P. 1322–1332.
16. *Kiselevsky D.B., Samuilov V.D.* Permeability of the plasma membrane for propidium iodide and destruction of cell nuclei in the epidermis of pea leaves: the effect of polyelectrolytes and detergents // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 3. P. 147–153.
17. *Khasanova L.M., Il'ina A.V., Varlamov V.P., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P.* Hydrolysis of chitozan with an enzyme complex from *Myceliophthora* sp. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2014. Vol. 50. N 4. P. 381–386.
18. *Luttge U., Higinbotham N.* Transport in plants. N.Y.: Springer Verlag, 1979. 468 pp.
19. *Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // *Cytometry.* 1992. Vol. 13. N 8. P. 795–808.
20. *Samuilov V.D., Lagunova E.M., Kiselevsky D.B., Dzyubinskaya E.V., Makarova Ya.V., Gusev M.V.* Participation of chloroplasts in plant apoptosis // *Biosci. Rep.* 2003. Vol. 23. N 2–3. P. 103–117.
21. *Samuilov V.D., Kiselevsky D.B., Shestak A.A., Nesov A.V., Vasil'ev L.A.* Reactive oxygen species in programmed death of pea guard cells // *Biochemistry (Mosc).* 2008. Vol. 73. N 10. P. 1076–1084.
22. *Karlsson M., Kurz T., Brunk U.T., Nilsson S.E., Frennsson C.I.* What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? // *Biochem. J.* 2010. Vol. 428. N 2. P. 183–190.

Поступила в редакцию 24.12.2020 г.

После доработки 05.02.2021 г.

Принята в печать 08.02.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of low molecular weight chitosan on epidermal cells from pea leaves

D.B. Kiselevsky^{1,*} , B.Ts. Shagdarova², V.P. Varlamov², O.V. Samuilova³, V.D. Samuilov¹

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

²Laboratory of Biopolymer Engineering, Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky ave. 33/2, Moscow, 119071, Russia;

³Department of Biochemistry, I.M. Sechenov University, Trubetskaya str. 8–2, Moscow, 119991, Russia
*e-mail: dkiselevs@mail.ru

The effect of low molecular weight (MW) chitosans with a MW of 5, 6, 10, 25, 45 kDa and a deacetylation degree (DD) of 85–99% obtained by chemical depolymerization and enzymatic hydrolysis on the cells of the epidermis of pea leaves was analyzed. Low MW chitosans induced guard cells plasma membrane damage, which was estimated from the change in its permeability for the fluorescent dye propidium iodide, and programmed death of epidermal cells determined from destruction of cell nuclei. These effects are similar to those of commercial high MW chitosan with a MW of 290 kDa, a DD of 90%, which was manifested at higher concentrations than with low MW chitosan. The destructive effect of chitosan on the cells was predominantly DD-dependent, and it was not produced at concentrations up to 10 µg/ml inclusive. Low MW chitosan enhanced the generation of reactive oxygen species in the epidermis, which was detected by monitoring the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein. The antioxidants nitroblue tetrazolium and propyl gallate inhibited, and H₂O₂ accelerated this process.

Keywords: *programmed cell death, plasma membrane, chitosan, epidermis, propidium iodide, pea*

Funding: The research on the production and analysis of low molecular weight chitosans was partially supported by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-016-00205. This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A16-116021660081-0.

Сведения об авторах

Киселевский Дмитрий Борисович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6050-2940>

Шагдарова Бальжима Цырендоржиевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории инженерии биополимеров Института биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-65-56; e-mail: shagdarova.bal@gmail.com

Варламов Валерий Петрович – докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией инженерии биополимеров Института биоинженерии, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Тел.: 8-499-135-65-56; e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Самуилова Ольга Витальевна – канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-495-622-96-73; e-mail: olga.v.samuilova@gmail.com

Самуилов Виталий Дмитриевич – докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.461.61:579.22:579.26

Оценка целлюлозоразрушающей активности актинобактерий, ассоциированных с муравьями**Ю.В. Закалюкина^{1,*} , А.Р. Зайцев¹ , М.В. Бирюков^{2,3} **

¹Кафедра биологии почв, факультет почвоведения, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Российская академия наук, Россия, 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Среди актинобактерий, выделенных из муравьев *Camponotus vagus*, *Formica cunicularia* и *Lasius niger*, а также материала их гнезд и интактных почв, был проведен отбор штаммов, обладающих высокой целлюлазной активностью на среде с карбоксиметилцеллюлозой, с применением красителя Конго красный. Тестирование культуральных жидкостей исследуемых штаммов на среде с карбоксиметилцеллюлозой в сравнении с растворами коммерческого препарата целлюлазы позволило произвести также количественную оценку активности отдельных штаммов, которая была подтверждена методом измерения эндо-1,4-глюконазной активности по методу с 3,5-динитросалициловой кислотой. Три наиболее активных штамма актинобактерий были выделены из муравьев *Camponotus vagus*, *Lasius niger* и *Formica cunicularia* и принадлежали к роду *Streptomyces*. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК штаммов *Streptomyces sp. Fu*₂, *Streptomyces sp. Ln*₉, *Streptomyces sp. Pe*₃ депонированы в GenBank под номерами MN227506, MN227508 и MG 705182 соответственно. Удельная эндоглюканазная и β-глюкозидазная активность данных штаммов соответствует таковой у целлюлозо- и лигнинразрушающих стрептомицетов, описанных в литературе.

Ключевые слова: актинобактерии, целлюлоза, целлюлазы, *Streptomyces*, муравьи, *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, *Formica cunicularia*

Целлюлоза – линейный полисахарид, состоящий из глюкозных субъединиц, соединенных β-1,4-гликозидными связями, самый распространенный биополимер на Земле. Обилие и доступность делают ее привлекательным сырьем для производства многих биотехнологически ценных продуктов, биоразлагаемых полимерных материалов, продуктов питания. Кроме того, учитывая современные тенденции на внедрение в производство «возобновляемых источников энергии», все более актуальным является использование целлюлозы для получения биотоплива [1]. К сожалению, в большинстве случаев основная часть целлюлозосодержащих отходов представляет собой сложную смесь целлюлозы с другими полимерами, балластными, а порой и токсичными примесями, что крайне затрудняет их переработку. Поэтому в большинстве случаев происходит утилизация таких отходов путем сжигания, что, помимо утраты перспективного сырья, приводит к увеличению концентрации парниковых газов и другим негативным последствиям для биосферы [2]. Решение данной задачи лежит в области биотехнологии, а первоочередной задачей является солюбилизация, расщепление целлюлозы до регулярных олигосахаридов, пригодных для дальнейшей переработки.

Биологическое разложение целлюлозы осуществляется комплексом целлюлаз, включающим, главным образом, эндоглюконазы (КФ 3.2.1.4) и экзоглюконазы (КФ 3.2.1.91), а также целлюбиазы (КФ 3.2.1.21). Для полного гидролиза природной целлюлозы до биодоступных мономеров необходим синергизм между всеми этими группами ферментов [1, 3]. Промышленно производятся и активно используются в различных отраслях целлюлазы, продуцируемые микроскопическими грибами, в основном представителями родов *Aspergillus* и *Trichoderma*. Однако целлюлазные системы ряда прокариот имеют свои уникальные особенности и могут обладать рядом преимуществ для биотехнологии: особыми оптимумами активности, субстратной специфичностью, термоустойчивостью [3]. Целлюлолитическую активность не раз отмечали у представителей порядка *Streptomycetales* [4, 5–9] – главным образом, среди представителей рода *Streptomyces*. Стрептомицеты – наиболее многочисленная группа мицелиальных прокариот в почвах, где они являются ведущими агентами в разложении целлюлозы и других природных полимеров [4, 7, 8, 10–12]. С недавнего времени внимание исследователей привлекают ассоциации микроорганизмов с бес-

позвоночными, питающимися древесиной или обитающими в ней, поскольку в таких сообществах могут обнаруживаться целлюлолитические микроорганизмы, развившие в результате коэволюции свойства, ценные для биотехнологии [2, 7–9, 13].

Несмотря на то, что многие исследователи обращались к теме поиска и выделения микроорганизмов-целлюлолитиков [2, 8–11, 13, 14], в этой области по-прежнему много методологических трудностей. Во-первых, природа целлюлозы сложна и гетерогенна, а во-вторых, работа с мицелиальными и медленно растущими формами прокариот делает выявление активных штаммов весьма трудоемким. Поэтому отработка методик поиска, выделения и эффективного анализа целлюлолитической активности актинобактерий по-прежнему очень актуальна.

Перспективными локусами для поиска микроорганизмов – активных продуцентов целлюлаз – могут являться гнезда черных муравьев-древоточцев *Camponotus vagus*, которые ранее не становились объектом подобного исследования. Этот западно-палеоарктический вид муравьев встречается по всей южной и средней Европе, на Украине, в южных областях России, на Кавказе и северо-западе Африки. Муравьи-дендробионты *C. vagus* предпочитают негустые лиственные и смешанные леса, сосновые боры, опушки, вырубки, где прогрызают ходы и камеры в сухой древесине [15]. В ходе жизнедеятельности эти муравьи постоянно контактируют как с отмершей древесиной, так и с почвой и, таким образом, могут создавать условия для отбора из окружающей среды штаммов микроорганизмов с заметной целлюлолитической активностью.

Целью настоящей работы является оценка перспективности природных локусов, связанных с муравьями *C. vagus*, с точки зрения выделения штаммов актинобактерий, обладающих целлюлозоразрушающей активностью. Кроме того, в задачи исследования входит оптимизация методик по выделению и отбору наиболее активных штаммов мицелиальных прокариот.

В конечном счете, расширение круга микробов-продуцентов целлюлаз, используемых в промышленности, может способствовать снижению стоимости ферментов для гидролиза растительной биомассы, что по-прежнему считается одной из основных задач достижения экономической целесообразности в конверсии лигноцеллюлозы [1].

В предыдущих работах мы сообщали о том, что из муравьев *Lasius niger* и *Formica cunicularia* были выделены мицелиальные прокариоты, в большинстве своем принадлежащие к роду *Streptomyces*, многие из которых проявляли целлюлолитическую активность [17]. В данной работе мы описываем выделение мицелиальных прокариот, связанных с муравьями-древоточцами,

а также представляем качественную и количественную оценку целлюлозоразрушающей способности у наиболее активных штаммов.

Материалы и методы исследования

Отбор образцов. Для исследования были выбраны два гнезда муравьев *C. vagus*: №1 – находящееся в Брянской области (Суземский район, дер. Березовка, 52.440009 N, 34.126288 E) и №2 – в Рязанской области (Касимовский район, пос. Елатьма, 55.004116 N 41.740807 E). Для поиска целлюлазноактивных актинобактерий были выбраны три типа субстратов: живые муравьи *C. vagus*, материал гнезда муравьев-древоточцев, представлявший собой древесину сосны разной степени разложения с включениями мхов, копролитов личинок насекомых, перемешанных с почвой, а также фоновые почвы, находящиеся на расстоянии не менее чем в 10 м от гнезд. Отбор проб производился в летне-осенний период в 2014 и 2015 гг. Образцы в стерильных крафтовых пакетах и контейнерах в максимально короткие сроки доставлялись в лабораторию.

Выделение мицелиальных прокариот. Для исследования из каждого гнезда отбирали пять взрослых особей *C. vagus*, усыпляли эфиром и каждую отдельно асептически истирали в ступке с песком (стерилизованном в автоклаве при 121°C) и 20 мл стерильной воды в течение трех минут. Навески гнездового материала весом 0,2 г также помещали в 20 мл стерильной воды. Полученные суспензии взбалтывали на шейкере «Multi Reax» (Heidolph, ФРГ) 10 мин при 2000 об./мин, 10-кратно разводили стерильной водопроводной водой и проводили посев на питательную среду с крахмалом (г/л): крахмал растворимый – 20, K_2HPO_4 – 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5, KNO_3 – 1, $NaCl$ – 0,5, $FeSO_4$ – 0,01, агар – 20; а также на среду с фильтровальной бумагой в качестве единственного источника углерода (г/л): K_2HPO_4 – 1, $CaCl_2$ – 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3, $NaCl$ – 0,1, $FeCl_3$ – 0,01, $NaNO_3$ – 2,5, агар – 20. Для подавления роста микромицетов и грамтрицательных бактерий в среды перед разливом добавляли нистатин (250 мкг/мл) и налидиксовую кислоту (10 мкг/мл) соответственно. Посевы инкубировали при 28°C в течение 2–3 нед.

Выросшие колонии мицелиальных прокариот просматривали, подсчитывали, выделяли в отдельные морфотипы согласно общности фенотипических признаков [16]. Филогенетическое положение представителей отдельных морфотипов проводили по схеме, изложенной ранее [17]. Последовательности фрагмента гена 16S рРНК, полученные для представителей отдельных морфотипов, были депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); на их основе было построено филогенетическое дерево в программе MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>).

Качественная оценка общей целлюлазной активности. Исследование общей целлюлазной активности проводилось как у только что выделенных актинобактерий, так и у штаммов мицелиальных прокариот, изолированных ранее из муравьев *L. niger* и *F. cunicularia* [17] и хранящихся в 20%-ном глицерине при -70°C . Всего было исследовано 68 штаммов актинобактерий: 29 выделены из почв, 14 – из гнезд и 12 – из муравьев *S. vagus*; 8 культур относились к муравьям *L. niger* и 5 – к муравьям *F. cunicularia*.

Все культуры актинобактерий были подвергнуты исследованию на способность вырабатывать внеклеточные целлюлазы. Для этого культуры сеяли уколом на среду [13] следующего состава (на литр водопроводной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5 г; KH_2PO_4 – 1 г; Na_2HPO_4 – 4 г; NaCl – 1,5 г; дрожжевой экстракт – 1 г; натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ; Akucell) – 10 г; Твин-80 – 1 мл; биотин – 1 мг; тиамин – 1 мг; агар – 20 г.

Спустя 14 сут культивирования при 28°C чашки с выросшими колониями окрашивали 0,1%-ным водным раствором красителя Конго красный (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин, затем дважды по 10 мин промывали 1М раствором NaCl [18]. По обесцвеченным зонам вокруг колоний судили о выделении внеклеточных целлюлаз. Сравнительную оценку целлюлазной активности изучаемых штаммов проводили на основе сопоставления индекса разложения КМЦ I_{CMC} (1):

$$I_{\text{CMC}} = \frac{S_{\text{zone}}}{S_{\text{colony}}}, \quad (1)$$

где S_{zone} – площадь осветленной зоны вокруг колонии штамма, мм^2 ,

S_{colony} – площадь колонии изучаемого штамма, мм^2 .

Для трех штаммов актинобактерий, характеризовавшихся максимальными значениями индекса I_{CMC} , была проведена полуколичественная оценка активности культуральной жидкости по гидролизу КМЦ на чашках Петри, а также исследованы эндо-1,4-глюканазная и β -глюкозидазная (целлюолиазная) активность.

Исследование активности культуральных жидкостей штаммов актинобактерий. В ячейки 24-луночных планшетов (Corning, США) помещали по 2 мл жидкой среды, содержащей КМЦ [13], и затем инокулировали споровыми суспензиями исследуемых штаммов (250 мкл с концентрацией 10^6 кл/мл), приготовленными в стерильной воде с добавлением 0,06% Твин 80. Засеянные планшеты инкубировали на орбитальном шейкере Titramax 1000 (Heidolph, ФРГ) при 275 об./мин в течение 7 сут при 28°C . Затем из каждой лунки отбирали аликвоты 1 мл, помещали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали 5 мин при 13 тыс.об./мин в настольной миницентрифуге MiniSpin (Eppendorf, ФРГ). Супернатант отбирали

и использовали для количественного измерения активности внеклеточных целлюлаз.

В качестве положительного контроля целлюлазной активности использовали препарат целлюлазы (Sigma-Aldrich, C1184), полученный из *Aspergillus niger* (с активностью не менее 0,3 МЕ/мг, где за единицу (МЕ) принимают то количество фермента, которое освобождает один микромоляр глюкозы при 37°C и рН 4,8 за 2 ч инкубации). Готовили серию последовательных разведений препарата с активностью: 1, 0,1, 0,01, 0,001 и т.д. МЕ/мл в 100 мМ ацетат-аммонийном буфере (рН 4,8). На среду с КМЦ с соблюдением стерильности устанавливали металлические полые цилиндрики («колодцы») диаметром 6 мм, в которые вносили по 100 мкл растворов препарата и культуральной жидкости изучаемых штаммов. После суточной инкубации при 28°C проводили окрашивания чашек Конго красным и определяли индекс разложения КМЦ, как описано выше. Строили калибровочную зависимость I_{CMC} от активности коммерческого фермента и использовали ее для полуколичественной оценки целлюлазной активности изучаемых штаммов актинобактерий.

Для более точной количественной оценки эндо-1,4-глюканазной активности использовали метод измерения ферментативной активности целлюлаз по гидролизу КМЦ с определением высвободившихся в ходе ферментативного гидролиза восстанавливающих сахаров с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты [4, 19]. В пробирку, содержащую 300 мкл раствора КМЦ (20 мг/мл) в 100 мМ ацетат-аммонийном буфере (рН 4,8), вносили 100 мкл супернатанта исследуемой культуральной жидкости, интенсивно перемешивали и инкубировали в течение 60 мин при 40°C . Измерения оптической плотности при 540 нм проводили на микропланшетном сканере Infinite 200F (Tecan, Швейцария). По полученным результатам оценивали эндо-1,4-глюканазную активность (в МЕ), принимая за единицу то количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 микромоля глюкозы из КМЦ за минуту при 40°C и рН 4,8.

Для определения β -глюкозидазной активности выделенных штаммов актинобактерий использовали суррогатный субстрат с ковалентно пришитой флуоресцентной меткой – 4-метилумбеллиферил β -D-глюкопиранозид (Sigma Aldrich, США) [11]. Супернатанты культуральных жидкостей объемом 50 мкл помещали в ячейки 96-луночного планшета, в каждую лунку добавляли по 100 мкл рабочего раствора флуоресцентного субстрата в ацетат-амонийном буферном растворе (рН 4,8) и инкубировали 30 мин при 37°C . Флуоресценцию регистрировали в микропланшетном сканере Infinite 200F при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 465 нм.

За единицу β -глюкозидазной активности (МЕ) принимали то количество фермента, кото-

рое катализирует высвобождение 1 микромоля 4-метилумбеллиферила в минуту при 37°C и pH 4,8 [11]. Все данные по целлюлазной активности приводили в расчете на общее содержание белка, которое оценивали по методу Бредфорд [20], используя растворы бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) как стандарты.

Все анализы и измерения проводили в трехкратной повторности, результаты выражали в виде средних значений с указанием доверительных интервалов (определяемых через среднеквадратичное отклонение согласно распределению Стьюдента для малых выборок) при уровне значимости 0,05. Обработка результатов исследований и графическое представление материалов осуществлялись с использованием программы Excel 10 (Microsoft Office).

Результаты и обсуждение

Все исследуемые штаммы мицелиальных прокариот были разделены на группы в зависимости от источника выделения (рис. 1) и исследованы на предмет способности расти и утилизировать КМЦ в качестве целлюлозного субстрата. Об уровне общей целлюлазной активности судили по коэффициенту разложения КМЦ (I_{CMC}), причем при расчете использовали соотношения площадей (1), а не ширину образовавшегося гало. Такой подход представляется более корректным, поскольку при росте на агаре и точечная, и крупная колонии могут образовать зону гидролиза одинаковой ширины. Однако очевидно, что при прочих равных колония меньшей площади может обладать большей гидролитической активностью.

Исследование выделенных из разных источников штаммов актинобактерий на способность гидролизовать целлюлозный субстрат (КМЦ) показало, что среди актинобактерий, выделенных из гнезд муравьев-древоточцев *C. vagus*, доля активных штаммов ($I_{CMC} \geq 10$) составляет 100% (рис. 1). Подобную целлюлазную активность продемон-

стрировала только половина штаммов, выделенных непосредственно из муравьев-древоточцев (рис. 1). Примечательно, что штаммы актинобактерий, выделенных из интактных почв, представляли собой практически равномерные ряды от активных до неактивных форм, в их числе были 13 штаммов, которые не росли или не образовали зон гидролиза на среде с КМЦ, и соответственно не отражены на диаграмме. Среди актинобактерий, выделенных из муравьев *F. cunicularia* и *L. niger*, доля активных разрушителей КМЦ была меньше 50%, однако среди них обнаружили наиболее активные изоляты ($I_{CMC} > 25$) (рис. 1).

Основная часть актинобактерий, изученных в рамках данной работы, принадлежала к роду *Streptomyces* как к наиболее распространенному и многочисленному в большинстве природных локусов наземных экосистем. Тем не менее, даже без применения селективных приемов для выделения «редких таксонов», нами были изолированы представители родов: *Amycolatopsis*, *Kribella*, *Micromonospora* (рис. 2).

Для дальнейшего изучения целлюлазной активности были выбраны три штамма, проявившие самую значительную активность на среде с КМЦ – Fu₂, Ln₉ и Pe₃ (рис. 1). Все три изолята принадлежали к роду *Streptomyces* (табл. 1): штамм Pe₃ выделен из муравьев *C. vagus* (гнездо №1), штаммы Fu₂ и Ln₉ выделены из взрослых рабочих особей *F. cunicularia* и *L. niger* соответственно [17].

Окраска агаризованной среды с КМЦ красителем Конго красный позволяет визуально обнаружить штаммы, растущие на данной среде и способные расщеплять целлюлозу, за счет реакции образования комплекса между красителем и негидролизированным полимером [2, 18]. В этом случае метод является качественным и характеризуется высокой скоростью, производительностью и относительной дешевизной, позволяя одновременно оценивать широкий круг штаммов. Ради-

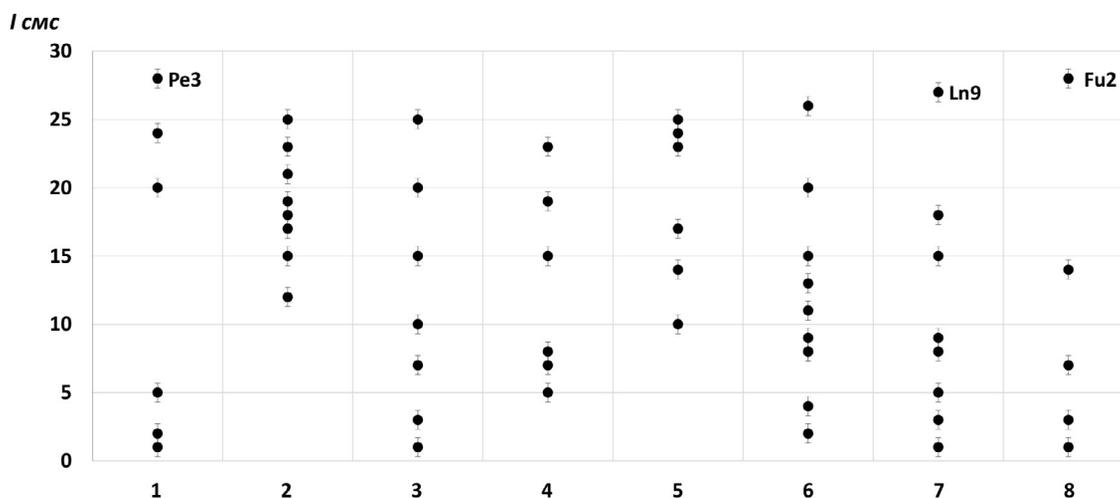


Рис. 1. Целлюлазная активность актинобактерий (оцениваемая по I_{CMC} – индексу разложения КМЦ), выделенных из различных местообитаний: из муравьев *C. vagus*, отобранных в Брянской (1) и Рязанской (4) области; материала их гнезд (2, 5); интактных почв (3, 6), а также штаммов, выделенных [17] из муравьев *L. niger* (7) и *F. cunicularia* (8).

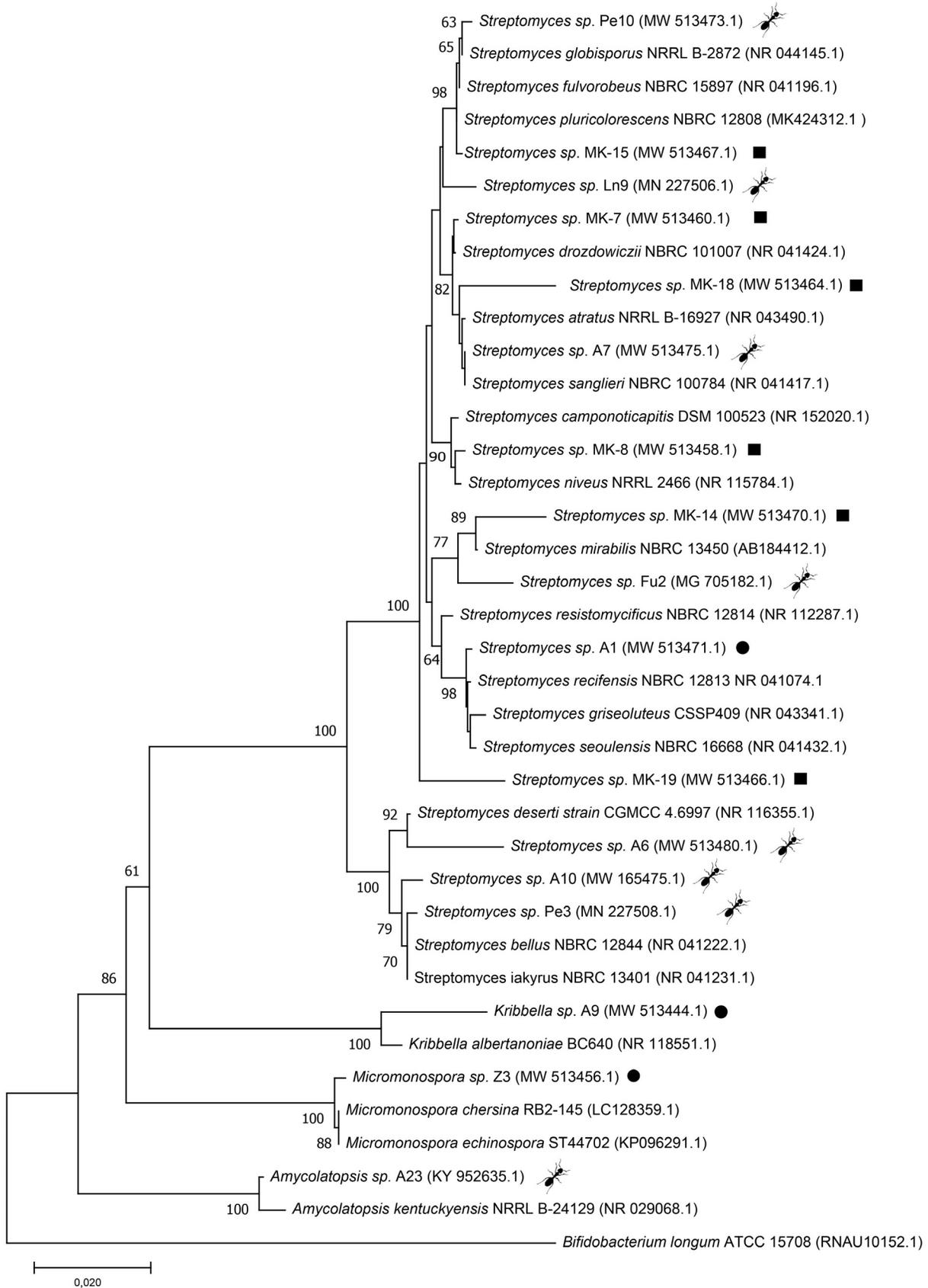


Рис. 2. Филогенетическое положение новых изолятов, выделенных из муравьев различных видов (☿), их гнезд (●) и intactных почв (■), а также типовых штаммов известных видов, наиболее близких им генетически, на основании анализа последовательностей фрагмента гена 16S рРНК (в скобках указаны номера доступа последовательностей в GenBank). Дерево построено методом присоединения соседей (neighbour-joining method). Эволюционные дистанции между последовательностями рассчитаны с использованием модели Тамуры-Ней (Tamura-Nei's model). Указаны значения (выше 60%) бутстрэп-анализа для 1000 альтернативных деревьев. Масштаб соответствует двум заменам на каждые 100 нуклеотидов. Штамм *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 выбран как референсный организм, не принадлежащий к филуму Actinobacteria.

альная диффузия фермента в агаровую пластину позволяет легко определить границу его активности — за счет четкого различия окрашенной и неокрашенных зон. Поскольку диаметр зоны диффузии фермента пропорционален логарифму его концентрации [18], данный метод также может быть использован для полуколичественной оценки целлюлолитической активности культуральных жидкостей изучаемых микроорганизмов. Необходимым условием для такого исследования является использование серии растворов коммерческого препарата целлюлазы для построения калибровочной зависимости (рис. 3). Графическая оценка КМЦ-активности супернатантов штаммов *Pe*₃, *Ln*₉ и *Fu*₂ по калибровочной прямой показала (рис. 3), что у изучаемых культуральных жидкостей значения активности предположительно лежат в пределах от 0,1 до 1 МЕ/мл соответствующей активности препарата целлюлазы *Aspergillus niger*.

Для более точной оценки целлюлолитической активности широко используется методика, со-

стоящая в измерении количества редуцирующих сахаров, образующихся после взаимодействия фермента с целлюлозным субстратом в присутствии 3,5-динитросалициловой кислоты [19]. При применении этой методики рекомендуется проводить измерения в пробирках объемом 25 мл, однако, на наш взгляд, исследование целлюлазной активности в формате микропланшета зарекомендовало себя как столь же точный, но гораздо более эффективный метод [22], позволяющий исследовать одновременно большое количество проб при очень малом объеме реакционной смеси.

Результаты оценки активности внеклеточных целлюлаз штаммов *Pe*₃, *Ln*₉ и *Fu*₂ более точным методом с динитросалициловой кислотой (табл. 2) показали значительное сходство с целлюлазной активностью, найденной графически (рис. 3), что позволяет рекомендовать последний как простой, не требующий больших материальных вложений и эффективный подход к поиску целлюлозоразрушающих штаммов.

Таблица 1

Характеристика штаммов актинобактерий, проявивших наибольшую целлюлазную активность

| Признаки | Штаммы | | |
|------------------------------------|---|--|---|
| | <i>Fu</i> ₂ | <i>Ln</i> ₉ | <i>Pe</i> ₃ |
| Источник выделения | Муравьи <i>F. cunicularia</i> | Муравьи <i>L. niger</i> | Муравьи <i>C. vagus</i> |
| Цвет воздушного мицелия* | Белый/ светло-серый/ серый | Светло-серый/серый/ серый | Отсутствовал/ светло-серый/ серый |
| Цвет субстратного мицелия* | Буро-черный/ темно-серый/ бесцветный | Бесцветный/желтоватый/ желтый | Бурый/ бесцветный/ буроватый |
| Наличие растворимого пигмента* | Буроватый/ отсутствовал/ отсутствовал | Буроватый/желтоватый/ желтый | Буроватый/отсутствовал/ отсутствовал |
| Образование меланоидного пигмента* | + | + | + |
| Форма цепочек спор** | RA (крючки, петли) | RF (прямые, короткие) | S (спиральные) |
| Ближайший типовой штамм | <i>Streptomyces rishiriensis</i> NRRL B-3239 | <i>Streptomyces zaomyceticus</i> NBRC 13348 | <i>Streptomyces iakurys</i> NBRC 13401 |
| Номер доступа в GenBank | MG705182.1 | MN227506.1 | MN227508.1 |

* — описание фенотипических признаков проводилось на средах ISP2, ISP3, ISP4 [21],

** — на среде ISP3 на 10–14-е сут.

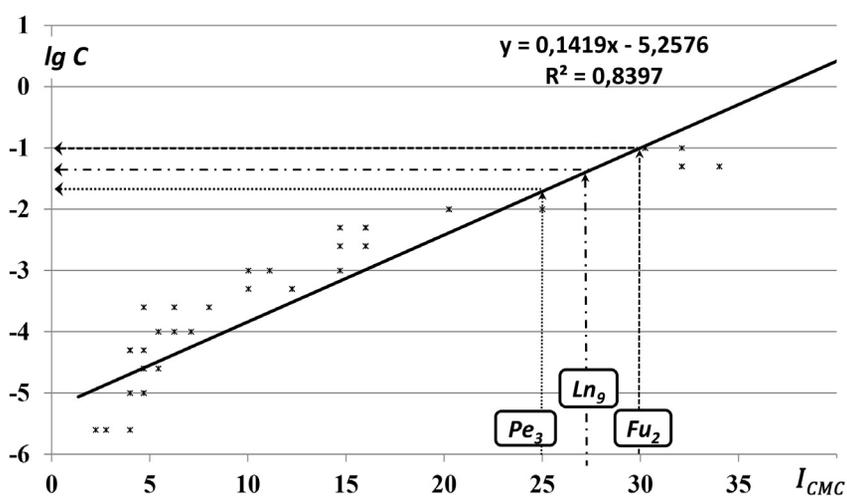


Рис. 3. Графическое определение активности гидролиза КМЦ ($\lg C$) культуральными жидкостями штаммов *Streptomyces* sp. *Fu*₂ (1,0 МЕ/мл), *Streptomyces* sp. *Ln*₉ (0,5 МЕ/мл), *Streptomyces* sp. *Pe*₃ (0,3 МЕ/мл) по индексу разложения КМЦ (I_{CMC}): калибровочная прямая построена по индексам разложения КМЦ для серии растворов коммерческой целлюлазы (Sigma-Aldrich, C1184) с известными значениями активности.

Таблица 2

Активность эндоцеллюлаз и целлюлоз целлюлоз отдельных штаммов актинобактерий, выделенных из муравьев

| Штаммы | Содержание белка, мг/мл | Эндо-1,4-глюконазная активность, МЕ/мл | Удельная эндо-1,4-глюконазная активность, МЕ/мг белка | β -глюкозидазная активность, МЕ/мл | Удельная β -глюкозидазная активность, МЕ/мг белка |
|-----------------|-------------------------|--|---|--|---|
| Fu ₂ | 0,06±0,001 | 0,12±0,009 | 18,61±1,12 | 0,11±0,006 | 1,86±0,09 |
| Ln ₉ | 0,05±0,002 | 0,52±0,041 | 10,42±0,52 | 0,07±0,006 | 1,31±0,06 |
| Pe ₃ | 0,03±0,002 | 1,11±0,076 | 4,0±1,96 | 0,001±0,0001 | 0,20±0,01 |

Культуры, показавшие способность к активно-гидролизу растворимых соединений целлюлозы, могут отбираться для более подробных исследований, в частности, для оценки β -глюкозидазной активности. Целлюлозы (более точно – β -глюкозидазы) не только продуцируют глюкозу из целлюлозы, но и снижают опосредованную целлюлозой репрессию ферментов предыдущих этапов разложения целлюлозы – эндо- и экзоцеллюлаз, тем самым позволяя целлюлолитическим ферментам функционировать более эффективно [1].

У микроорганизмов внеклеточная β -глюкозидаза обычно продуцируется на гораздо более низком уровне, чем эндоцеллюлазы, поскольку дополняется также и деятельностью пула внутриклеточных целлюлоз, что согласуется с данными, полученными для штаммов актинобактерий Pe₃, Ln₉ и Fu₂ (табл. 2). В целом, целлюлолитическая активность актинобактерий, выделенных в рамках данного исследования, находится на сходном уровне с активностью целлюлозо- и лигнинразрушающих стрептомицетов, описанных в литературе [3–5].

Поиск целлюлозоразрушающих актинобактерий у различных видов насекомых, в особенности тех, чей жизненный цикл связан с древесной растительностью, является оправданным [7, 8, 13]. Исследователи полагают, что стрептомицеты, находящиеся в ассоциациях с подобными насекомыми, могут реализовывать «внутреннюю или внешнюю пищеварительную модель» [7]. «Внутренняя пищеварительная модель» подразумевает нахождение актинобактерий в желудочно-кишечном тракте хозяев, где они выделяют ферменты, способствующие перевариванию насекомыми сложных полимеров. Понятно, что такие взаимоотношения будут создаваться с теми насекомыми, которые питаются трудно разлагаемой растительной биомассой [9, 13]. «Внешняя пищеварительная модель» возникает, когда насекомые, прокладывая ходы в древесине, способствуют заселению ее сообществом дереворазрушающих микроорганизмов и затем используют в пищу продукты деградации растительной биомассы [7, 8, 23]. И хотя муравьи-древоточцы не питаются продуктами разложения древесины, в которой обитают, своей активной строительной деятельностью они могут способствовать заселению и формированию в гнездах сообществ микроорганизмов, способных к утилизации природных полимеров.

Действительно, в нашем исследовании все культуры, выделенные из гнезд муравьев-древоточцев,

проявляли заметную целлюлолитическую активность, в то время как доля активных штаммов, выделенных из муравьев *C. vagus*, не превышала 50%. Оказалось также, что и из муравьев других видов, таких как *F. cunicularia* и *L. niger*, могут быть выделены отдельные штаммы с высоким уровнем целлюлозной активности. Образцы почв, рассматриваемые в работе как интактные, закономерно послужили источником выделения наибольшего количества штаммов мицелиальных прокариот, однако среди них было обнаружено и наибольшее количество неактивных штаммов.

В наших предыдущих работах было показано, что актинобактерии, выделяемые из муравьев-древоточцев, обладают способностью к выделению метаболитов, обладающих антибактериальной [24, 25] и антигрибной активностью [26]. Микроскопические грибы являются ведущими агентами по разложению древесины в природе, но близкое соседство с ними в гнездах было бы для муравьев-древоточцев крайне неблагоприятно, поскольку многие микромицеты могут легко переходить от сапротрофного к паразитическому типу питания. Есть основания полагать, что между муравьями *C. vagus* и актинобактериями могут складываться так называемые «защитные симбиозы», описанные в литературе для других видов насекомых [27]. Заселение гнезд муравьев сообществами актинобактерий, способных использовать целлюлозу как источник питания, с одной стороны, и ограничивать рост грибов, с другой, могло бы служить защитой гнезд от заселения потенциально патогенными видами микроорганизмов.

Таким образом, гнезда муравьев-древоточцев *C. vagus* можно рассматривать как природный локус обитания мицелиальных прокариот, обладающих целлюлозоразрушающей активностью. Использование несложных, но эффективных методик по обнаружению и оценке целлюлозной активности у новых штаммов актинобактерий позволит шире использовать их для нужд биотехнологии.

От души благодарим анонимных рецензентов за ценные советы и помощь в подготовке материала. Работа выполнена без поддержки государственных или частных фондов. Исследования выполнены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lynd L.R. The grand challenge of cellulosic biofuels // Nat. Biotechnol. 2017. Vol. 35. N 10. P. 912–915.
2. Wilson D.B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis // Curr. Opin. Microbiol. 2011. Vol. 14. N 3. P. 259–263.
3. Gupta P., Samant K., Sahu A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential // Int. J. Microb. 2012. Vol. 2012: 578925.
4. Venterino V., Ionata E., Birolo L., Montella S., Marcolongo L., de Chiaro A., Espresso F., Faraco V., Pepe O. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7: 2061.
5. Zhang Y-H.P., Hong J., Ye X. Cellulase assays // Biofuels: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 581 / Eds. J.R. Mielenz. Humana Press, 2009. P. 213–231.
6. McCarthy A.J., Williams S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review // Gene. 1992. Vol. 115. N. 1–2. P. 189–192.
7. Book A.J., Lewin G.R., McDonald B.R., Takasuka T.E., Doering D.T., Adams A.S., Blodgett J.V.A., Clardy J., Raffa K.F., Fox B.G., Currie C.R. Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose // Appl. Environ. Microb. 2014. Vol. 80. N 15. P. 4692–4701.
8. Takasuka T.E., Book A.J., Lewin G.R., Currie C.R., Fox B.G. Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces* // Sci. Rep. 2013. Vol. 3: 1030.
9. Watanabe Y., Shinzato N., Fukatsu T. Isolation of actinomycetes from termites' guts // Biosci. Biotech. Bioch. 2003. Vol. 67. N 8. P. 1797–1801.
10. Wachinger G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W. L., Schrempf H. Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli* // Appl. Environ. Microb. 1989. Vol. 55. N 10. P. 2653–2657.
11. Semêdo L.T.A.S., Gomes R.C., Bon E.P.S., Soares R.M.A., Linhares L.F., Coelho R.R.R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil // Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology / Eds. M. Finkelstein and B.H. Davison. Totowa, N.J.: Humana Press, 2000. P. 267–276.
12. Chater K.F., Biro S., Lee K.J., Palmer T., Schrempf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces* // FEMS Microbiol. Rev. 2010. Vol. 34. N 2. P. 171–198.
13. Pasti M.B., Belli M.L. Cellulolytic activity of Actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut // FEMS Microbiol. Lett. 1985. Vol. 26. N 1. P. 107–112.
14. Johnsen H.R., Krause K. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. N 1. P. 830–838.
15. Радченко А.Г. Обзор муравьев рода *Camponotus* (Hymenoptera, Formicidae) палеарктики. Введение. Подрод *Camponotus s str* // Зоол. журн. 1997. Т. 76. № 5. С. 554–564.
16. Zakalyukina Yu.V., Golichenkov M.V., Brovkina O.I., Putyatina T.S. Comparative study of actinomycete communities associated with *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants and their nests // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 3. P. 118–124.
17. Zakalyukina Yu.V., Biryukov M.V., Golichenkov M.V., Netrusov A.I. Phenotypic and phylogenetic characterization of actinomycetes isolated from *Lasius niger* and *Formica cunicularia* ants // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 1. P. 13–19.
18. Wood P.J., Erfle J.D., Teather R.M. Use of complex formation between Congo Red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases // Methods in enzymology, vol. 160 / Eds. J. Abelson and M. Simon. Academic Press, 1988. P. 59–74.
19. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // Pure Appl. Chem. 1987. Vol. 59. N 2. P. 257–268.
20. Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation // The protein protocols handbook / Eds. J.M. Walker. Humana Press, 1994. P. 9–15.
21. Shirling E.B., Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. Vol. 16. N 3. P. 313–340.
22. Yu X., Liu Ya., Cui Yu., Cheng Q., Zhang Z., Lu J.H., Meng Q., Teng L., Ren X. Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay // Saudi J. Biol. Sci. 2016. Vol. 23. N 1. Suppl. P. S93–S98.
23. Scott J.J., Oh D.C., Yuceer M.C., Klepzig K.D., Clardy J., Currie C.R. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism // Science. 2008. Vol. 322. N 5898. P. 63.
24. Zakalyukina Y.V., Biryukov M.V., Shiriaev D.I., Komarova E.S., Skvortsov D.A., Tashlitsky V.N., Polshakov V.I., Sergiev P.V., Osterman I.A. Nybomycin-producing streptomyces isolated from carpenter ant *Camponotus vagus* // Biochimie. 2019. Vol. 160. P. 93–99.
25. Osterman I.A., Wieland M., Maviza T.P., et al. Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel // Nat. Chem. Biol. 2020. Vol. 16. N 10. P. 1071–1077.
26. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. Chemical ecology of *Streptomyces albidoflavus* strain A10 associated with carpenter ant *Camponotus vagus* // Microorganisms. 2020. Vol. 8. N 12: 1948.
27. Kaltenpoth M., Engl T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera // Funct. Ecol. 2014. Vol. 28. N 2. P. 315–327.

Поступила в редакцию 27.10.2020 г.

После доработки 02.02.2021 г.

Принята в печать 08.02.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Study of cellulose-destroying activity of actinobacteria associated with ants

Yu.V. Zakalyukina^{1,*} , A.R. Zaytsev¹ , M.V. Biryukov^{2,3} 

¹Department of Soil Biology, School of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Sciences, Bol'shaya Pirogovskaya ul. 11, Moscow, 119021, Russia

*e-mail: juline@soil.msu.ru

Among actinobacteria associated with various species of ants, their nests and intact soils, cellulolytic activity was screened on a medium with carboxymethyl cellulose using Congo red dye. Assessment of culture broses of tested strains on the CMC-plates and comparing them with titred solutions of the commercial cellulase preparation allowed to quantify their activity. This data were confirmed by the method of evaluating endo-1,4-gluconase activity according to the DNS method. The three most active strains of actinobacteria were isolated from the ants *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, and *Formica cunicularia* and belong to the genus *Streptomyces*. The 16S rDNA sequences of the *Streptomyces* sp. Fu₂, *Streptomyces* sp. Ln₉, and *Streptomyces* sp. Pe₃ strains were deposited in the GenBank under the numbers MN227506, MN227508, and MG 705182 respectively. Specific endoglucanase and β-glucosidase activity of this strains corresponds to that of cellulose- and lignin-destroying streptomycetes described in the literature.

Keywords: *actinobacteria*, *cellulose*, *cellulase*, *Streptomyces*, *ants*, *Camponotus vagus*, *Lasius niger*, *Formica cunicularia*

Funding: The research was done without support of government or private funds.

Сведения об авторах

Закалюкина Юлия Владимировна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-44-46; e-mail: juline@soil.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8943-5761>

Зайцев Андрей Романович – магистр по направлению подготовки «Почвоведение» факультета почвоведения МГУ. Тел.: 8-495-939-44-46; e-mail: andrew050795@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0642-4069>

Бирюков Михаил Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-59-46; e-mail: biryukov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5765-1221>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 572.087

**Индексы подкожного и висцерального жираотложения
и их связь с комплексом эндогенных и экзогенных факторов
в группе взрослого населения Республики Алтай****А.Н. Роккина^{1,*} , А.Э. Праведникова^{2,3} , Ю.В. Шидловский^{2,3} ,
Е.В. Попова⁴ , Л.В. Задорожная¹ , И.А. Хомякова¹ **

¹Научно-исследовательский институт и Музей антропологии, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 1, стр. 1;

²ФГБУН Институт биологии гена РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

⁴кафедра физического воспитания и спорта, физиологии и безопасности жизнедеятельности, Горно-Алтайский государственный университет, Россия, 649000, г. Горно-Алтайск, ул. Ленкина, д. 1

*e-mail: ann.rokk@gmail.com

Проведен анализ связей комплекса антропогенетических и средовых факторов со значениями индексов подкожного и висцерального жираотложения, определяемых в локальных отведениях биоимпедансного анализа в группе взрослых мужчин и женщин – этнических алтайцев. Было обследовано 110 «условно здоровых» мужчин (62) и женщин (48) – представителей коренных народов Алтая – в возрасте от 17 до 35 лет. Программа обследования включала антропометрическое обследование, определение состава тела с использованием биоимпедансометрии (анализатор ABC-02 «Медасс»), измерение локальных импедансов в абдоминальной области, определение генотипов по полиморфным системам генов разобщающих белков *UCP1-3*. Показан половой диморфизм по большинству исследованных морфофункциональных признаков. Для индексов подкожного и висцерального жираотложения выявлен высокий уровень корреляционной зависимости с индексом центрального ожирения и долей жировой массы тела. Эндогенные признаки пол, возраст и число «бережливых» аллелей генов разобщающих белков 1-3 не оказывают значимого влияния на индексы подкожного и висцерального жираотложения в обследованной группе лиц молодого возраста (17–35 лет). В результате отбора информативных признаков с помощью метода случайного леса и алгоритма «Boost» было выявлено, что ведущими предикторами, ассоциированными с абдоминальной топографией жираотложения в обследованной группе, являются WHtR (Waist-to-height ratio – отношение обхвата талии к длине тела) и %ЖМ (процент жировой массы в организме).

Ключевые слова: абдоминальное жираотложение, локальная импедансометрия, висцеральный жир, *UCP*, антропометрия, физическая нагрузка

В современном мире от последствий избыточного веса и ожирения умирает больше людей, чем от последствий дефицита массы тела [1]. Люди с ожирением значительно отличаются друг от друга по характеру распределения жира (топографии), что обуславливает различные риски развития заболеваний, коморбидных ожирению. В связи с этим выделяют несколько типов ожирения, самым неблагоприятным из которых является абдоминальный тип, когда основная масса жира расположена в области живота. Абдоминальное ожирение несет более высокие риски развития диабета 2 типа и осложнений в работе сердца, а также является независимым фактором, увеличивающим риск преждевременной смерти и инва-

лидности у взрослых [2]. Таким образом, топография жираотложения является самостоятельным признаком, тесно связанным с риском развития и тяжестью течения кардиометаболических заболеваний [3]. Абдоминальное жираотложение складывается из двух компонентов: подкожного и висцерального жира, которые отличаются по анатомическим, молекулярно-физиологическим и метаболическим свойствам, а также ассоциированы с различными рисками развития и тяжестью кардиометаболических нарушений [4]. Прямая количественная оценка висцерального и подкожного жираотложения проводится с помощью методов компьютерной и магнитно-резонансной томографии, которые, несмотря на свою точность,

обладают рядом ограничений (лучевая нагрузка, использование радиоактивного контрастного вещества, дорогостоящая аппаратура, использовать которую возможно только стационарно, высокая стоимость и продолжительность исследования). По этим причинам невозможно использование данных методов в экспедиционных и скрининговых исследованиях. Поэтому были разработаны и валидированы методы не прямой количественной оценки висцерального и подкожного жира с использованием локальной импедансометрии [5, 6]. Возможность использования отечественного биоимпедансного оборудования для раздельной оценки подкожного и висцерального жира была показана в работе Соловьевой с соавт. [7].

Кроме энергетического дисбаланса, формирующегося в результате действия экзогенных факторов (социально-экономические, уровень физической активности, пищевые привычки и др.), причиной повышенного жира может являться генетическая предрасположенность. Полиморфизм генов разобщающих белков *UCP1-3* (rs1800592, rs660339, rs1800849) активно изучается в аспекте предрасположенности к ожирению. В ряде исследований показано, что точечные мутации в этих генах ассоциированы с повышенным риском ожирения и развития кардиометаболических заболеваний [8, 9]. Мутантные аллели генов *UCP1-3* являются «бережливыми» и детерминируют повышенный уровень жира, в том числе абдоминального [10, 11].

Республика Алтай занимает лидирующие позиции по уровню детского, подросткового и взрослого ожирения по сравнению с другими субъектами РФ [12]. Антропометрические исследования показали, что коренные народы, населяющие территорию республики, имеют склонность к абдоминальному жиру вне зависимости от половозрастных и социально-экономических факторов [13]. Целью настоящего исследования являлось изучение связей традиционных антропометрических признаков и индексов, характеризующих особенности жира, а также пола, возраста, полиморфизма генов *UCP1-3* и уровня регулярной физической активности с показателями подкожного и висцерального жира в абдоминальной области, полученными с помощью локальной импедансометрии.

Материалы и методы

Общая характеристика выборки. Было обследовано 110 условно здоровых мужчин (62) и женщин (48) — представителей коренных народов Алтая в возрасте от 17 до 35 лет, проживающих на территории Республики Алтай. 76 человек были обследованы в г. Горно-Алтайск, 34 — в Улаганском районе. Обследование было проведено

в июне 2018 г. В ходе анкетирования были установлены: этническая принадлежность добровольцев, уровень регулярной физической нагрузки (высокая или низкая), семейное положение, уровень образования и др.

Антропометрическое обследование. Антропометрическое обследование проводилось по стандартной методике [14] с использованием антропометрических инструментов GPM (DKSH, Швейцария) и включало в себя измерение длины и массы тела, толщины кожно-жировых складок (КЖС) на корпусе и конечностях, ширины костных эпифизов и костных диаметров, окружностей корпуса и конечностей. Была проведена оценка компонентного состава тела с использованием анализатора ABC-02 «Медасс» (НТЦ «Медасс», Россия) [15]. Биоимпедансный анализ (БИА) выполнялся с использованием одноразовых электродов (F3001, FIAV, Италия) при частоте зондирующего тока 50 кГц в трех отведениях:

1. По стандартной тетраполярной схеме «запястье — голеностопный сустав» на правой стороне тела с наложением электродов при положении испытуемых лежа на спине.

2. Располагали токовые электроды на расстоянии 12 см, а измерительные электроды — на расстоянии 7 см слева и справа от пупка при положении испытуемых стоя (для оценки подкожного жира в абдоминальной области) [5].

3. Устанавливали токовые электроды в надпупочной точке и симметричной ей точке на спине в горизонтальной плоскости, а измерительные электроды — на левой стороне тела в той же горизонтальной плоскости на расстоянии 1/8 окружности талии от точек установки токовых электродов (для оценки висцерального жира в абдоминальной области). Измерение также проводилось при положении испытуемых стоя [6].

При помощи программного обеспечения ABC01-0362 (НТЦ «Медасс», Россия) были определены показатели активного и реактивного сопротивления (R , Ом — для первого отведения; R_s , Ом — для второго отведения; R_v , Ом — для третьего отведения), абсолютные значения жировой (ЖМ), скелетно-мышечной (СММ) и безжировой массы (БЖМ). Для оценки топографии жира были рассчитаны следующие антропометрические индексы: ИМТ (индекс массы тела) = масса тела, кг/(длина тела, м)²; WHtR (waist-to-height ratio, индекс центрального ожирения) = обхват талии, см/длина тела, см; индекс Т/Б (индекс талия/бедро, WHR — waist-to-hip ratio) = обхват талии, м/обхват бедра, м; BAI (body adiposity index, индекс жирности) = (обхват ягодиц, см/(длина тела, м)^{1.5}) — 18.

Для не прямой оценки подкожного жира в абдоминальной области был рассчитан индекс подкожного жира — ИПЖ ($R_s \times OT^2 \times 10^{-4}$ —

произведение значения активного сопротивления во втором отведении и квадрата окружности талии (ОТ)). Для непрямо́й оценки висцерального жира был рассчитан индекс висцерального жира – ИВЖ ($R_v \times OT^2 \times 10^{-4}$ – произведение значения активного сопротивления в третьем отведении и квадрата окружности талии). Термины «индекс висцерального жира» и «индекс подкожного жира» были введены ранее [7].

Генотипирование. Геномную ДНК получали из образцов буккального эпителия с помощью набора реагентов CO₂DIS SPRINT (ООО «ГОРДИЗ», Россия) согласно протоколу производителя. Для определения полиморфных вариантов генов *UCP1* (rs1800592), *UCP2* (rs660339), *UCP3* (rs1800849) использовали двухстадийную полимеразную цепную реакцию (ПЦР), где продукты амплификации первой реакции с парой праймеров для каждого гена служили матрицей для ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) с новыми парами праймеров и флуоресцирующими зондами. Для первого этапа ПЦР использовали пары праймеров: 5'-TTAGTGATAATAAATATATCCTCTCTCCCA и 5'-AAGTAGGAGAAAGTTTGCCTCAGGTT для *UCP1*, 5'-GCATCGCAGATCTCATCACC и 5'-ACCCTTGCTCCATACTCAGC для *UCP2*, 5'-CCTTGTACCAAGGAAGCGT и 5'-TGCTCTGTGAAAGCCTCCAAT для *UCP3*. Условия амплификации включали начальную денатурацию при 95°C в течение 2 мин, 35 циклов: денатурация – 30 с при 95°C, отжиг праймеров – 30 с при 58,5°C, элонгация – 30 с при 72°C. ПЦР в реальном времени проводили с использованием системы CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США), набора реагентов НПО «СибЭнзим» (Россия) и пар праймеров и флуоресцирующих зондов: 5'-TATTTCCAGTGGTGGCTAATGA и 5'-GTGGCAGCAAGTTCTGAATGT, FAM-CAAA TGCACCTTGATCAAACCTGTGGTCAATCAGAAAT CGCT-RTQ1 и R6G-CAAATGCACTCGATCAAAC TGTGGTCAATCAGAAATCGCT-RTQ1 для *UCP1*; 5'-GGAGCATCGAGATGACTGGAG и 5'-CCGGCAACCAGCCCAT, Cy5-CGGTACTGGGCGCTGGCTGT-RTQ2 и Cy5.5-CGGTACTGGGCGCTGACTGT-RTQ2 для *UCP2*; 5'-TTAAAGCACCCCAAGTCAAGAGG и 5'-GTGGCAGCAGGGATTGGAT, Cy5-AAGGTTTCAGGTCAGCCCGTGTGTATAAGAC-RTQ2 и ROX-AAGGTTTCAGGTCAGCCCTGTGTATAAGAC-RTQ2 для *UCP3*. Условия амплификации включали предварительную денатурацию в течение 10 мин при 95°C, 50 циклов: денатурация – 15 с при 95°C, отжиг праймеров – 30 с при 59,5°C, элонгация – 30 с при 72°C. Постановка реакций для *UCP1* и *UCP2* осуществлялась в мультиплексе. Генотип определяли по уровню флуоресценции соответствующего красителя. Общее количество индиви-

дов, для которых было выполнено генотипирование: *UCP1* – 97, *UCP2* – 91, *UCP3* – 96.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка полученных данных проводилась в среде R [16]. Для разведочного анализа данных был использован протокол, рекомендованный Zuur et al. [17], который включал анализ выбросов (тест Граббса, package “outliers”), проверку нормальности распределения (критерий Шапиро-Уилка) и проверку гомоскедастичности в подгруппах исследуемой выборки (тест Левене) (package “car”). Анализ значимости различий между мужчинами и женщинами по признакам, распределение которых отличалось от нормального, проводили с использованием критерия Манна-Уитни, для признаков, имеющих нормальное распределение (длина тела, процент жировой массы (%ЖМ), удельный обмен веществ), использовали t-критерий Стьюдента. Для анализа корреляций между признаками рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена. Анализ связей показателей висцерального и подкожного жира отложения с комплексом исследуемых признаков проводили с использованием алгоритма «случайного леса» (package “randomForest”). Прогнозирование выполнялось по 500 деревьям, было использовано 55% и 90% (для ИВЖ и ИПЖ соответственно) исходных переменных. Эффективность моделей оценивалась с помощью 10-кратной перекрестной проверки. Оценку важности предикторов проводили при помощи алгоритма «Voruta» (package “Voruta”).

Биоэтика. Обследование было проведено с соблюдением правил биоэтики. Было получено положительное заключение локального комитета по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 91-о от 24.05.2018г.). Все добровольцы, участвовавшие в обследовании, были осведомлены о целях и методах обследования и дали свои информированные согласия. Генетические образцы были зашифрованы, все данные анализировались в обезличенном виде.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании впервые для взрослого населения Республики Алтай была апробирована методика раздельной косвенной оценки подкожного и висцерального жира отложения в абдоминальной области с использованием отечественного биоимпедансного анализатора и был проведен анализ связей полученных показателей с традиционными антропометрическими признаками, отражающими количество жира и его топографию, некоторыми генетическими маркерами риска развития ожирения, половозрастными признаками и уровнем регулярной физической активности. В обследованной выборке частоты встречаемости минорных аллелей *UCP1* rs1800592-G,

UCP2 rs660339-T, UCP3 rs1800849-T составили 0,35, 0,22, 0,37 соответственно. Частоты встречаемости генотипов составили 0,48/0,33/0,19 (AA, AG, GG – UCP1), 0,66/0,22/0,12 (CC, CT, TT – UCP2), 0,41/0,49/0,10 (CC, CT, TT – UCP3). В исследуемой выборке по большинству признаков были обнаружены значимые различия между мужчинами и женщинами (табл. 1): у мужчин значимо выше значения признаков, связанных с абдоминальным жиротложением, в том числе ИПЖ и ИВЖ, однако значимые различия в %ЖМ и ИМТ отсутствуют. Ранее был описан половой диморфизм в уровне висцерального жиротложения: у мужчин висцерального жира больше, чем у женщин, при меньшем значении общей ЖМ тела [18].

Таблица 1

Значения основных антропометрических признаков в подгруппах обследованной выборки

| | Мужчины (n = 62) | | | Женщины (n = 48) | | |
|---------------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| | Me | Q1 | Q3 | Me | Q1 | Q3 |
| ДТ, см** | 172,3 | 167,0 | 178,8 | 158,1 | 154,5 | 162,5 |
| ОТ, см** | 77,40 | 71,70 | 82,70 | 69,75 | 66,30 | 76,00 |
| МТ, кг*** | 67,2 | 58,5 | 74,9 | 54,8 | 51,3 | 60,2 |
| ИМТ, кг/кв.м. | 22,31 | 21,02 | 25,49 | 21,63 | 19,83 | 24,36 |
| Индекс Т/Б** | 0,83 | 0,80 | 0,87 | 0,75 | 0,73 | 0,81 |
| WHtR* | 0,45 | 0,43 | 0,50 | 0,43 | 0,42 | 0,47 |
| ИПЖ* | 23,23 | 14,33 | 30,85 | 13,01 | 10,13 | 21,33 |
| ИВЖ* | 7,06 | 4,59 | 10,08 | 4,85 | 4,18 | 7,48 |
| ФУ, град.** | 7,29 | 6,95 | 7,74 | 6,29 | 5,90 | 6,69 |
| %ЖМ | 21,81 | 15,56 | 28,07 | 19,84 | 15,22 | 25,62 |
| СММ, кг | 28,0 | 19,6 | 32,1 | 26,6 | 19,8 | 31,2 |
| БЖМ, кг | 51,2 | 41,0 | 59,1 | 47,7 | 40,7 | 57,0 |

Примечание: Me – медиана; Q1 – нижний квартиль; Q3 – верхний квартиль; ДТ – длина тела; ОТ – обхват талии; МТ – масса тела; ИМТ – индекс массы тела; индекс Т/Б – отношение обхвата талии к обхвату бедер; WHtR (Waist-to-Height Ratio) – отношение обхвата талии к длине тела; ИПЖ – индекс подкожного жира; ИВЖ – индекс висцерального жира; ФУ – фазовый угол; %ЖМ – процент жировой массы; СММ – скелетно-мышечная масса; БЖМ – безжировая масса. Значения признаков, различия по которым между мужчинами и женщинами достигает уровня значимости: *** – <0,001; ** – <0,01; * – <0,05 (Критерий Манна-Уитни, t-критерий Стьюдента).

В качестве предикторов для ИПЖ и ИВЖ были рассмотрены эндогенные (полиморфизм генов UCP1-3, пол и возраст) факторы, а также различные антропометрические признаки, в том числе традиционно используемые в медицине для диагностики висцерального ожирения: ИМТ, ОТ, индекс Т/Б, WHtR [19, 20]. Была показана высокая значимая корреляционная связь ИПЖ и ИВЖ с индексом WHtR и %ЖМ (табл. 2), остальные признаки имеют средний уровень связи с ИПЖ и ИВЖ. Корреляция антропометрических признаков и индексов, отражающих количество жира и его топографию, с ИВЖ в целом оказалась гораздо слабее и зачастую не достигала уровня статистической значимости.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции параметров жиротложения в абдоминальной области, измеренных в локальных отведениях методом импедансометрии, с традиционными антропометрическими признаками и индексами

| | Мужчины (n = 62) | | Женщины (n = 48) | |
|-----------------------------|------------------|---------|------------------|---------|
| | ИПЖ | ИВЖ | ИПЖ | ИВЖ |
| ОГ | 0,32*** | 0,06 | 0,43*** | 0,04* |
| ОТ | 0,36 | 0,09 | 0,58*** | 0,09* |
| ОРП | 0,34*** | 0,14* | 0,53*** | 0,11** |
| КЖС над подвздошным гребнем | 0,37*** | 0,13* | 0,49*** | 0,10* |
| СДГ | 0,28** | 0,09 | 0,35*** | 0,01** |
| МТ | 0,30*** | 0,03 | 0,47*** | 0,07* |
| ИМТ | 0,35*** | 0,12* | 0,49*** | 0,10** |
| Индекс Т/Б | 0,35*** | 0,19* | 0,61*** | 0,17 |
| WHtR | 0,75*** | 0,85*** | 0,53*** | 0,68*** |
| %ЖМ | 0,75*** | 0,74*** | 0,56** | 0,66*** |
| СММ | -0,09 | -0,04 | -0,15 | -0,07 |
| БЖМ | 0,04 | 0,11 | -0,09 | 0,04 |

Примечание: ОГ – обхват груди; ОТ – обхват талии; ОРП – обхват расслабленного плеча; КЖС над подвздошным гребнем – косая кожно-жировая складка на животе; СДГ – сагитальный диаметр груди; МТ – масса тела; ИМТ – индекс массы тела; индекс Т/Б – отношение ОТ к обхвату бедер; WHtR (Waist-to-Height Ratio) – отношение обхвата талии к длине тела; %ЖМ – процент жировой массы в организме; СММ – скелетно-мышечная масса; БЖМ – количество безжировой массы в организме; корреляции значимы на уровне: *** – <0,001; ** – <0,01; * – <0,05.

В результате отбора информативных признаков с помощью метода случайного леса и алгоритма «Воруга» было выявлено, что ведущими предикторами, ассоциированными с абдоминальной топографией жиротложения в обследованной группе, являются WHtR и %ЖМ. Вероятно, оба указанных признака могут быть более информативными для оценки абдоминального жиротложения, чем ИМТ, ОТ и индекс Т/Б. Доля объясненной изменчивости ИПЖ для модели случайного леса составила 64% (остаточная сумма квадратов = 94,39; ошибка наблюдений, не попавших в сумку = 12,3%). Доля объясненной изменчивости ИВЖ для модели случайного леса составила 55% (остаточная сумма квадратов = 25,46; ошибка наблюдений, не попавших в сумку = 10,1%). Признаки, вошедшие в каждую модель, показаны на рисунке. К признакам, которые оказывают значимое влияние на оба индекса абдоминального жиротложения, относятся: WHtR, %ЖМ, фазовый угол, безжировая масса, обхват расслабленного плеча, удельный обмен веществ и содержание скелетно-мышечной массы. ИМТ, индекс Т/Б и масса тела, широко используемые в скрининговых исследованиях, не связаны с ИВЖ, но являются значимыми для ИПЖ. Высокие значения ИПЖ связаны с большими значениями толщины кожно-жировых складок на корпусе и конечностях, обхватов корпуса и конечностей, а также с поперечными размерами скелета (сагит-

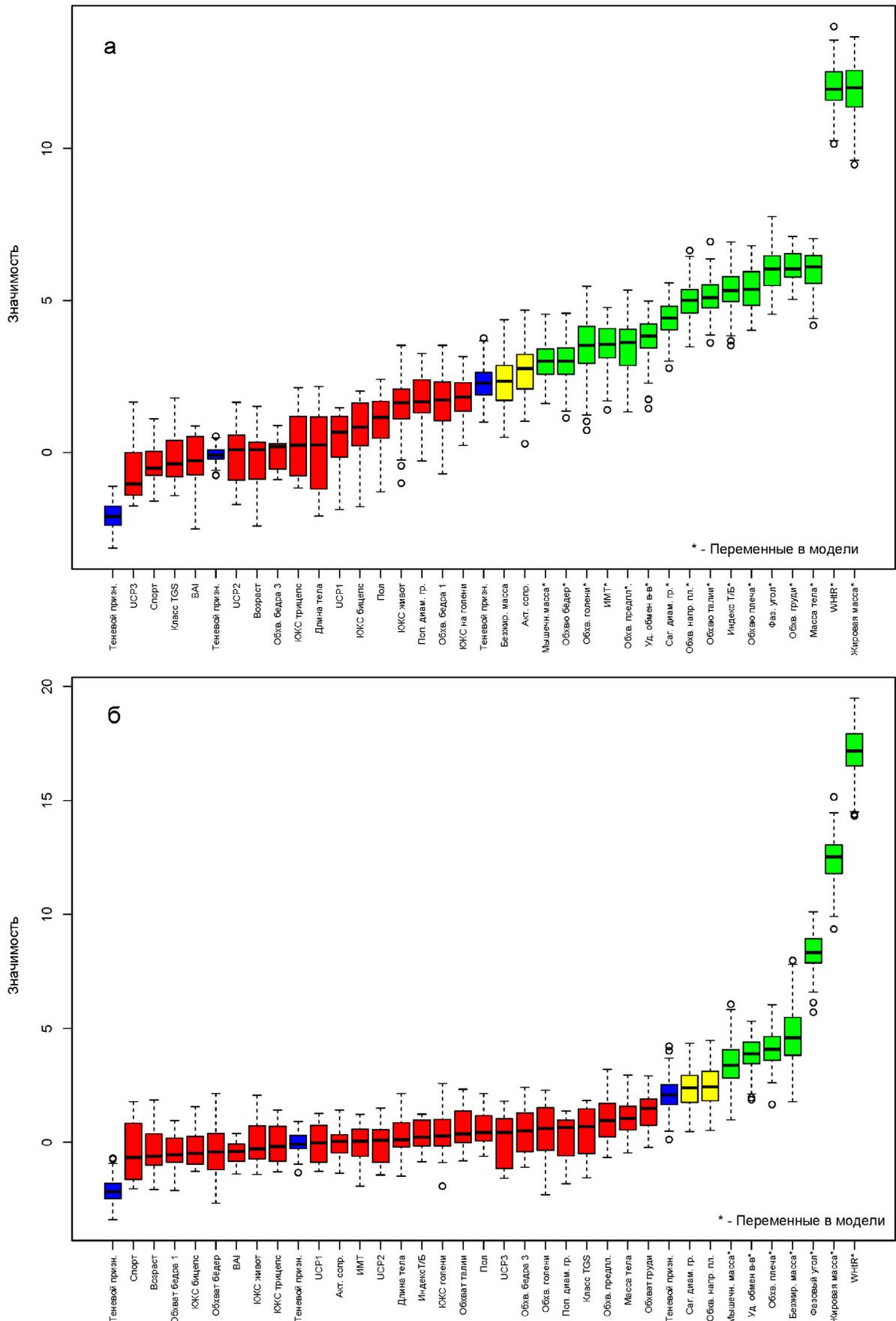


Рисунок. Ранжирование предикторов с использованием алгоритма «Voruta». Пояснения: А – для ИПЖ ($R_s \times OT^2 \times 10^{-4}$), Б – для ИВЖ ($R_v \times OT^2 \times 10^{-4}$). Зеленым цветом показаны признаки, вошедшие в предсказательную модель и являющиеся значимыми для соответствующих индексов, красным цветом – признаки вне модели, синим цветом показана важность для значений теневых признаков.

тальным диаметром грудной клетки и шириной локтя). При этом ИВЖ не связан с толщиной кожно-жировых складок. Это позволяет предположить, что накопление висцерального жира является относительно независимым процессом, на который влияет обособленный комплекс факторов. Результаты показывают, что величина фазового угла, характеризующего уровень физической активности, и связанное с ним количество БЖМ и, вероятно, СММ могут быть одними из ведущих морфофункциональных признаков, определяющих висцеральное жиротложение, так как ранжирование значимости предикторов выделило морфологические и функциональные признаки, связанные с развитием скелетных мышц (БЖМ, СММ, фазовый угол, удельный обмен веществ). Эндогенные признаки пол, возраст и число «бережливых» аллелей генов *UCP1-3* не оказывают значимого влияния на ИПЖ и ИВЖ в обследованной группе лиц молодого возраста (17–35 лет).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Официальный сайт Всемирной организации здравоохранения [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (дата обращения: 25.08.2020).

2. Ibrahim M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences // *Obes. Rev.* 2010. Vol. 11. N 1. P. 11–18.

3. Tanaka T., Kishi S., Ninomiya K., Tomii D., Koseki K., Sato Y., Okuno T., Sato K., Koike H., Yahagi K., Komiyama K., Aoki J., Tanabe K. Impact of abdominal fat distribution, visceral fat, and subcutaneous fat on coronary plaque scores assessed by 320-row computed tomography coronary angiography // *Atherosclerosis*. 2019. Vol. 287. P. 155–161.

4. Jialal I., Devaraj S. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome // *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2018. Vol. 33. N 1. DOI: 10.1515/hmbci-2017-0074.

5. Scharfetter H., Schlager T., Stollberger R., Felsberger R., Hutten H., Hinghofer-Szalkay H. Assessing abdominal fatness with local bioimpedance analysis: basics and experimental findings // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001. Vol. 25. N 4. P. 502–511.

6. Ryo M., Maeda K., Onda T., Katashima M., Okumiya A., Nishida M., Yamaguchi T., Funahashi T., Matsuzawa Y., Nakamura T., Shimomura I. A new simple method for the measurement of visceral fat accumulation by bioelectrical impedance // *Diabetes Care*. 2005. Vol. 28. N 2. P. 451–453.

7. Соловьева А.Е., Гиль-Ордонес Э., Гонзалес-Корреа К.Х., Руднев С.Г. Применение локальной импедансометрии для оценки подкожного и висцерального жиротложения в абдоминальной области у студентов вуза // *Морфология*. 2019. Т. 156. № 4. С. 85–90.

8. Sámano R., Huesca-Gómez C., López-Marure R., Hernández-Cabrera A.K., Rodríguez-Ventura A., Tolentino M., Morales R.M., Gamboa R. Association

К ограничениям исследования можно отнести молодой возраст обследованных и относительно небольшой объем выборки. В перспективе представляется интересным исследование ИПЖ и ИВЖ в группах лиц с диагностированными кардиометаболическими заболеваниями, а также расширение исследуемых этнических и возрастных групп.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№№18-09-00258, 18-59-94015, 20-49-04004 p_a), также плановой темы НИР № АААА-А19-119013090163-2 «Антропология евразийских популяций» МГУ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Протоколы исследования были утверждены локальным комитетом по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 91-о от 24.05.2018 г.).

between UCP polymorphisms and adipokines with obesity in Mexican adolescents // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2018. Vol. 31. N 5. P. 561–568.

9. Pravедnikova A. E., Shevchenko S. Y., Kerchev V. V., Kerchev V. V., Skhirtladze M. R., Larina S. N., Kachaev Z. M., Egorov A. D., Shidlovskii Y. V. Association of uncoupling protein (Ucp) gene polymorphisms with cardiometabolic diseases // *Mol. Med.* 2020. Vol. 26. N 1: 51.

10. Brondani L.A., Assmann T.S., de Souza B.M., Bouças A.P., Canani L.H., Crispim D. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N 5: e96411.

11. Salopuro T., Pulkkinen L., Lindström J., Kolehmainen M., Tolppanen A.M., Eriksson J.G., Valle T.T., Aunola S., Ilanne-Parikka P., Keinänen-Kiukaanniemi S., Tuomilehto J., Laakso M., Uusitupa M. Variation in the UCP2 and UCP3 genes associates with abdominal obesity and serum lipids: the Finnish Diabetes Prevention Study // *BMC Med. Genet.* 2009. Vol. 10. N 1: 94.

12. Официальный сайт Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Алтай [Электронный ресурс]. 2006–2015. URL: <http://04.gospotrebnadzor.ru/index.php/press-center/healthy-lifestyle/11171-12082019.html> (дата обращения: 25.08.2020).

13. Хомякова И.А., Балинова Н.В. Антропологические исследования в Республике Алтай: предварительный анализ морфологических особенностей северных и южных алтайцев // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 23. Антропол.* 2017. № 4. С. 28–41.

14. Негашева М.А. Основы антропометрии. М.: Экон-Информ, 2017. 216 с.

15. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М.: Наука, 2009. 392 с.

16. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Электронный ресурс] // R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. URL: <https://www.R-project.org/> (дата обращения: 25.08.2020).

17. Zuur A. F., Ieno E. N., Elphick C. S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems // *Methods Ecol. Evol.* 2010. Vol. 1. N 1. P. 3–14.

18. Browning L. M., Mugridge O., Dixon A. K., Aitken S. W., Prentice A. M., Jebb S. A. Measuring abdominal adipose tissue: comparison of simpler methods with MRI // *Obes. Facts.* 2011. Vol. 4. N 1. P. 9–15.

19. Fang H, Berg E, Cheng X, Shen W. How to best assess abdominal obesity // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2018. Vol. 21. N 5. P. 360–365.

20. Pouliot M. C., Jean-Pierre Després J. P., Lemieux S., Moorjani S., Bouchard C., Tremblay A., Nadeau A., Lupien P. J. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women // *Am. J. Cardiol.* 1994. Vol. 73. N 7. P. 460–468.

Поступила в редакцию 22.09.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята в печать 02.02.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Subcutaneous and visceral fat indices and their relationship with the complex of endogenous and exogenous factors in the group of adult population of the Altai Republic

A.N. Rokkina^{1,*} , A.E. Pravednikova^{2,3} , Yu.V. Shidlovskii^{2,3} , E.V. Popova⁴ ,
L.V. Zadorozhnaya¹ , I.A. Khomyakova¹ 

¹Research Institute and Museum of Anthropology, Lomonosov Moscow State University, Mokhovaya str. 11–1, Moscow, 125009, Russia;

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova str. 34/5, Moscow, 119334, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya str. 8–2, Moscow, 11999, Russia;

⁴Gorno Altaisk State University, Lenkina str. 1, Gorno-Altai, 649000, Russia

*e-mail: ann.rokk@gmail.com

The aim of the study was to analyze the association between complex of anthropogenetic and environmental factors with subcutaneous and visceral fat indices measured by local configurations of bioimpedance analysis in group of ethnic Altaians. In this study we examined whether anthropogenetic and environmental factors contributed to subcutaneous (SFI) and visceral fat indexes (FVI) measured by local configurations of bioimpedance analysis among ethnic Altaians. The study included 110 relatively healthy participants aged 17 to 35 years; 48 were female (44%). The examination program included anthropometric measurements, buccal swabs collection for genetic analysis (*UCPI-3*, rs1800592, rs660339, rs1800849) and body composition assessment by using bioelectrical impedance analysis (ABC-02 “Medass”), which was applied using a conventional whole-body «wrist-to-ankle» measurement configuration and two local measurement configurations in the abdominal region for the assessment of subcutaneous and visceral fat. Significant gender-related differences were found in the most morphological and functional characteristics. Maximal correlations were shown for subcutaneous and visceral fat indexes with WHtR and body fat percentage. Endogenous factors such as sex, age and genotype were not found to have significant effect on SFI and VFI in the examined group. Informative feature selection was performed by random forest and Boruta algorithm and WHtR and body fat percentage were revealed as the key predictors of abdominal fat deposition indexes.

Keywords: *abdominal obesity, local impedancemetry, visceral fat, UCP, anthropometry, physical activity*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research (project numbers 18-09-00258, 18-59-94015, 20-49-040004 r_a) and was performed under the state assignment of Moscow State University (project number 19-119013090163-2).

Сведения об авторах

Роккина Анна Николаевна – лаборант НИИ и Музея антропологии МГУ; магистрант кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-629-40-70; e-mail: ann.rokk@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0809-2088>

Праведникова Анна Эрнестовна – мл. науч. сотр. лаборатории регуляции экспрессии генов в развитии Института биологии гена РАН; аспирант кафедры биологии и общей генетики Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-499-135-40-96; e-mail: pravednikova.anyu@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4572-5318>

Шидловский Юлий Валерьевич – докт. биол. наук, зав. лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Института биологии гена РАН; зав. кафедрой биологии и общей генетики Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-499-135-40-96; e-mail: yul.biogen@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3643-9889>

Попова Елена Викторовна – канд. биол. наук, доц. кафедры физического воспитания и спорта, физиологии и безопасности жизнедеятельности, Горно-Алтайский государственный университет. Тел.: 8-38822-6-73-66; e-mail: ms.biolog@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4241-3669>

Задорожная Людмила Викторовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИ и Музея антропологии МГУ. Тел.: 8-495-629-40-70; e-mail: mumla@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8819-5329>

Хомякова Ирина Анатольевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИ и Музея антропологии МГУ. Тел.: 8-495-629-40-70; e-mail: irina-khomyakova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2811-2034>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 578+57.037+57.083

**Кинетика термоинактивации вируса гриппа
A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии полиаллиламина****Н.А. Контаров^{1,2,*} , Е.И. Долгова² , И.В. Погарская² ,
Е.О. Контарова³ , Н.В. Юминова² **

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет),
Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,
Россия, 115088, Москва, пер. Малый Казенный, д. 5а;

³Федеральный научно-клинический центр, Федеральное медико-биологическое агентство,
Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

*e-mail: kontarov@mail.ru

В настоящее время все большее место в противовирусной терапии отводится различным полиэлектролитам. Для полиэлектролита полиаллиламина с молекулярной массой 6000 Да показана противовирусная активность в отношении вирусов гриппа, кори, простого герпеса 1-го типа и цитомегаловируса. Ранее нами была определена нетоксическая концент-рация полиаллиламина, равная 30 мкМ, при которой сохраняется противовирусный эффект для кори и гриппа, но отсутствует токсическое воздействие на клетки. При этом известно, что одновременное воздействие на вирус физических факторов среды и химических соединений способствует более выраженному снижению инфекционности вируса. Одним из таких физических факторов является температура, воздействие которой на вирус приводит к его инактивации. Изучение параметров термоинактивации имеет важное практическое значение при разработке противогриппозных вакцин, а также для изучения снижения инфекционной активности вирусных частиц при оседании их на различных поверхностях. В связи с этим особый интерес представляет изучение кинетических и термодинамических характеристик процесса термоинактивации вируса гриппа в присутствии противовирусного соединения полиаллиламина. В настоящей работе мы показали, что процесс термоинактивации вируса гриппа в присутствии полиаллиламина в интервале температур 38–60°C описывается кинетикой реакции первого порядка. Термодинамические параметры термоинактивации указывают на вовлечение в процесс инактивации поверхностных белков вируса гриппа вследствие взаимодействия с ними полиаллиламина. Полученные результаты указывают на возможность использования полиаллиламина в качестве соединения, ускоряющего процесс термической инактивации вируса гриппа.

Ключевые слова: полиэлектролит, полиаллиламин, вирус гриппа, термоинактивация, гемагглютинирующая активность, инфекционность вируса

В настоящее время ужесточаются требования по получению инактивированных гриппозных вакцин с целью снижения поствакцинальных осложнений. Для инактивации вирусов гриппа применяют различные физические, химические и биологические методы [1–4]. Применение только физических методов часто бывает недостаточным для инактивации вакцинного штамма вируса, в связи с чем дополнительно используются различные химические соединения, вызывающие инактивацию антигенных белков вируса, в частности гемагглютинина, при повышении температуры. При этом происходит снижение гемагглютинирующей активности (ГА) вируса и его инфекционности. В данной работе таким соединением является полиэлектролит (ПЭ) полиалли-

ламин (ПАА) с молекулярной массой 6000 Да, для которого ранее нами был выявлен противовирусный эффект в отношении вирусов кори и гриппа в концентрации 30 мкМ [5], проявляющийся в снижении их инфекционности при отсутствии токсического действия данного ПЭ на клетки.

Материалы и методы

Вирус гриппа. Штамм вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) получен из коллекции Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (Москва, Россия) в виде вируссодержащей суспензии, материал хранили при температуре -80°C.

Полиэлектролит. В работе использовали ПЭ – гидрохлорид ПАА с молекулярной массой

$M_w = 6000$ Да в конечной концентрации 30 мкМ (Sigma, США). Раствор ПАА в фосфатном буфере имел значение $pH = 7,4$.

Культура клеток. Клетки эпителия почки спаниеля MDCK II выращивали на среде DMEM с добавлением пенициллина (100 ед./мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% фетальной телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [8]. В основе этого колориметрического метода лежит способность клеток метаболизировать тетразолиевый краситель МТТ, изменяя его окраску. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрически через 24 и 48 ч при длине волны 590 нм.

Гемагглютинирующая активность вируса. ГА вируса определяли с помощью реакции гемагглютинации с использованием 1,5%-ой суспензии куриных эритроцитов [9, 10]. Исходная ГА штамма составила 32 ГАЕ/мл (единиц гемагглютинирующей активности/мл).

Инфекционность вируса. Инфекционный титр вируса определяли по количеству фокусобразующих единиц (ФОЕ) и выражали в ФОЕ/мл [11]. Вирусную суспензию добавляли к монослою клеток MDCK II. Концентрация клеток в лунке составляла $5 \cdot 10^4$ клеток. Множественность инфекции составляла 0,01. Инфицирование проводили 1 ч в темноте при комнатной температуре, после чего удаляли вирусную суспензию. Затем клетки выращивали в 5% CO_2 при 37°C в среде DMEM–Avicel с добавлением 1,25% микрокристаллической целлюлозы (Sigma, США), 0,36% бычьего сывороточного альбумина и трипсина, обработанного ингибитором химотрипсина L-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Через 29 ч культуральную жидкость сливали, клетки фиксировали в течение 90 мин ледя-

ным 70%-ным этанолом. Затем обрабатывали мышиными антителами к белку NP вируса гриппа, а после – вторичными антимышиными антителами, меченными пероксидазой хрена (Sigma, США). С целью выявления пероксидазы хрена готовили два раствора: первый – диметилформамид – 2,5 мл, 3-амино-9-этилкарбазол – 10 мг, второй – H_2O_2 0,2 мл в 0,2 М ацетатном буфере, $pH = 5,0$. Два раствора смешивают и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее плашку сканировали и подсчитывали число ФОЕ. Исходное значение инфекционного титра вируса составило $5,4 \cdot 10^6$ ФОЕ/мл.

Термоинактивация вируса. Термоинактивация вируса гриппа проводилась в отсутствие и при добавлении ПАА в вирусосодержащую суспензию в конечной концентрации 30 мкМ. Инкубация проходила в диапазоне температур 45–60°C для определения снижения по отношению к исходной, принятой за 100%, ГА (ГАЕ, %) в течение 60 мин и при температуре 38–60°C для определения снижения по отношению к исходному, принятому за 100%, инфекционного титра (ФОЕ, %) в течение 180 мин. Все эксперименты с вирусом гриппа проводились в лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Статистическую обработку результатов, полученных из четырехкратных повторов каждого эксперимента, проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 в Excel 2010 (Microsoft Office). Аппроксимацию кинетических кривых также проводили в Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Как следует из приведенных на рис. 1 (А, Б) кинетических кривых для ГА и инфекционного

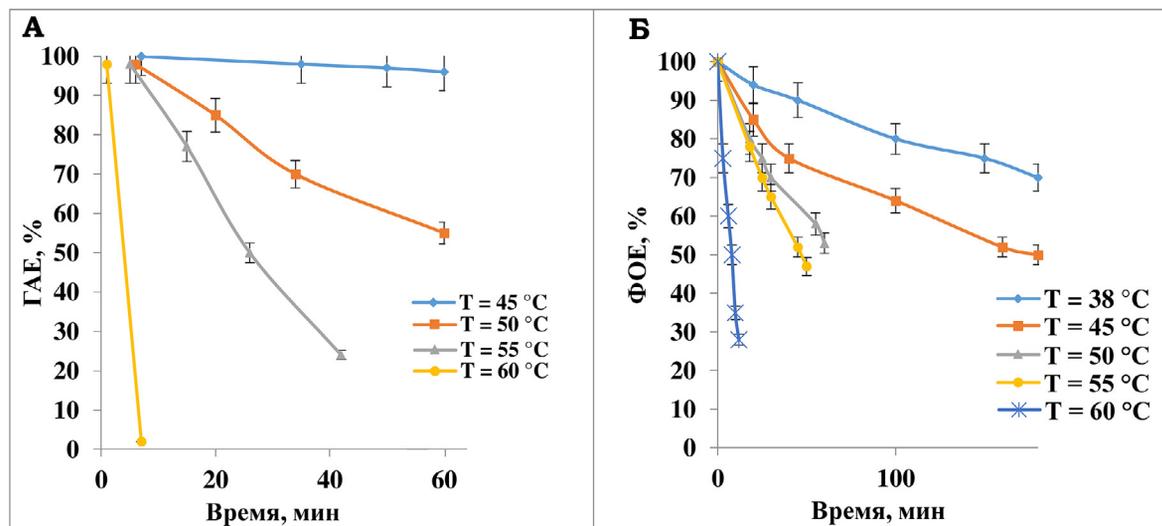


Рис. 1. Графическая оценка термической инактивации. А – изменение гемагглютинирующей активности вируса гриппа А/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА, $pH = 7,4$. Ось абсцисс – время, мин; ось ординат – ГАЕ, %. Б – изменение инфекционной активности вируса гриппа А/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА, $pH = 7,4$. Ось абсцисс – время, мин; ось ординат – ФОЕ, %.

титра вируса гриппа, процесс термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА описывается кинетической реакцией первого порядка:

$$R \xrightarrow{k_{in}} R_{in}, \tag{1}$$

$$\ln\left(\frac{[R_t]}{[R_0]}\right) = -k_{in}t, \tag{2}$$

где R и R_{in} – активная и инактивированная формы вируса соответственно, $[R_t]$ – ГА и инфекционный титр вируса в момент времени t процесса термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА, $[R_0]$ – исходная ГА и инфекционный титр, k_{in} – константа скорости термоинактивации, мин^{-1} , которую находили с помощью аппроксимации кинетических зависимостей термоинактивации экспоненциальными функциями с показателем экспоненты $-k_{in}t$. В табл. 1, 2 приведены значения констант скоростей термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА и без добавления ПЭ. Из результатов, приведенных в табл. 1, 2 видно, что константы скорости термоинактивации в присутствии 30 мкМ ПАА выше, чем при инактивации в отсутствие ПЭ. Это может быть объяснено инактивирующим вкладом ПАА, связываю-

щимся с поверхностными белками вириона, в процесс термоинактивации, что приводило к увеличению скорости снижения ГА и инфекционного титра вируса. Используя кинетические параметры термоинактивации вируса гриппа и теорию активированного комплекса Эйринга, определили термодинамические параметры термоинактивации в присутствии и в отсутствие ПАА: активационные энтальпия ΔH^\ddagger и энтропия ΔS^\ddagger (рис. 2):

$$k_{in} = \frac{k_b T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}, \tag{3}$$

где T – температура, k_b – постоянная Больцмана, равная $1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К, h – постоянная Планка, равная $6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с.

Значения активационной энтальпии и энтропии в отсутствие ПАА для ГА и инфекционности вируса составили: $\Delta H_1^\ddagger = -124,5 \pm 8,1$ кДж/моль, $\Delta H_2^\ddagger = -141,27 \pm 4,6$ кДж/моль; $\Delta S_1^\ddagger = 63,14 \pm 1,8$ кДж/К·моль, $\Delta S_2^\ddagger = 104,75 \pm 5,4$ кДж/К·моль соответственно. Значения активационной энтальпии и энтропии в присутствии 30 мкМ ПАА для ГА и инфекционности вируса были следующими: $\Delta H_1^\ddagger = -373,95 \pm 14,7$ кДж/моль, $\Delta H_2^\ddagger =$

Таблица 1

Константы скорости термоинактивации вируса гриппа в отсутствие ПАА

| $k_{in}, \text{мин}^{-1}$ | $T = 38^\circ\text{C}$ | $T = 45^\circ\text{C}$ | $T = 50^\circ\text{C}$ | $T = 55^\circ\text{C}$ | $T = 60^\circ\text{C}$ |
|--|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Термоинактивация гемагглютинирующей активности вируса ($p < 0,05$) | – | $(2,780,05) \cdot 10^{-5}$ | $(1,510,024) \cdot 10^{-4}$ | $(3,430,062) \cdot 10^{-4}$ | $(2,320,05) \cdot 10^{-4}$ |
| Термоинактивация инфекционности вируса ($p < 0,05$) | $(2,870,048) \cdot 10^{-6}$ | $(1,320,01) \cdot 10^{-5}$ | $(3,290,061) \cdot 10^{-5}$ | $(4,500,078) \cdot 10^{-5}$ | $(1,300,02) \cdot 10^{-5}$ |

Таблица 2

Константы скорости термоинактивации вируса гриппа в присутствии 30 мкМ ПАА

| $k_{in}, \text{мин}^{-1}$ | $T = 38^\circ\text{C}$ | $T = 45^\circ\text{C}$ | $T = 50^\circ\text{C}$ | $T = 55^\circ\text{C}$ | $T = 60^\circ\text{C}$ |
|--|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Термоинактивация гемагглютинирующей активности вируса ($p < 0,05$) | – | $(8,00,09) \cdot 10^{-5}$ | $(1,100,02) \cdot 10^{-3}$ | $(4,00,06) \cdot 10^{-2}$ | $(6,50,08) \cdot 10^{-2}$ |
| Термоинактивация инфекционности вируса ($p < 0,05$) | $(2,00,04) \cdot 10^{-3}$ | $(4,010,07) \cdot 10^{-3}$ | $(1,900,022) \cdot 10^{-2}$ | $1,50 \cdot 10^{-2}$ | $(1,050,02) \cdot 10^{-1}$ |

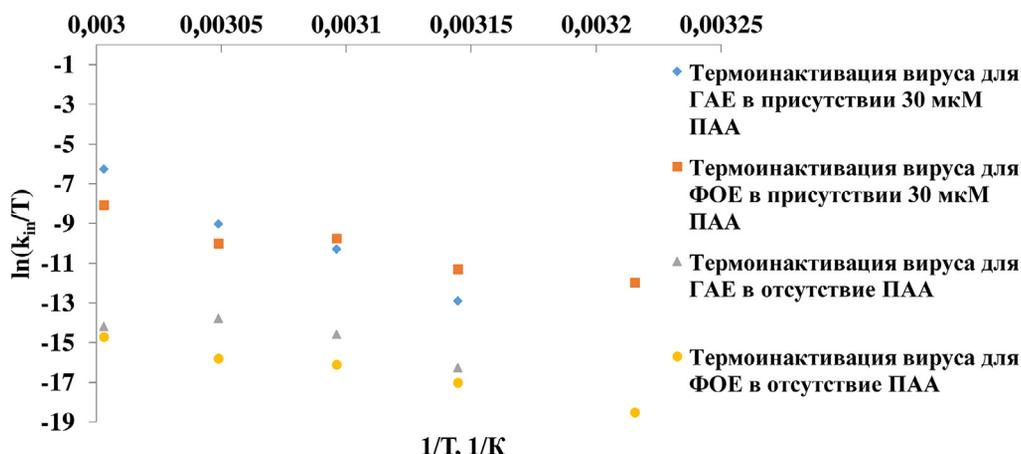


Рис. 2. Определение энтальпии и энтропии термоинактивации вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии 30 мкМ ПАА и без добавления ПАА, рН = 7,4. Ось абсцисс – $1/T, 1/К$; ось ординат – $\ln(k_{in}/T)$.

$= -142,93 \pm 4,8$ кДж/моль; $\Delta S_1^\ddagger = 871,4 \pm 21,2$ кДж/К·моль, $\Delta S_2^\ddagger = 160,44 \pm 5,8$ кДж/К·моль соответственно. Полученные значения термодинамических параметров термоинактивации можно интерпретировать следующим образом. Высокие отрицательные значения активационной энтальпии для ГА и инфекционного титра указывают на наличие процесса инактивации поверхностных белков вириона, причем более высокое значение активационной энтальпии для инфекционного титра связано с вовлечением в процесс снижения инфекционной активности вируса только белковых структур без включения в процесс рибонуклеопротеина. Высокие положительные значения активационной энтропии характерны при наличии гидрофобного эффекта в процессе инактивации поверхностных гликопротеинов вириона. Показатели активационной энтальпии термоинактивации вируса в присутствии 30 мкМ ПАА значительно выше для ГА, а для инфекционного титра значимо не отличаются от таковой для термоинактивации в отсутствие ПАА. Это объясняется взаимодействием ПАА с поверхностными гликопротеинами вириона гриппа, вносящим дополнительный энергетический вклад в процесс термоинактивации. Примерно одинаковые значения активационной энтропии для инфекционного титра могут объясняться наличием взаимодействия ПАА не только с поверхностными белками, но и с рибонуклеопротеином вируса. Высокое положительное значение активационной энтропии термоинактивации ГА вируса в присутствии ПАА связано с процессом дегидратации поверхностных белков при их инактивации. Дополнительную информацию о термодинамическом вкладе ПАА в процесс дегидратации поверхностных гликопротеинов при термоинактивации вируса может дать значение инкремента молярной теплоемкости Δc_p . Зная активационную энтропию и используя формулу (4), можно рассчитать инкремент молярной теплоемкости термоинактивации ГА и инфекционного титра вируса:

$$\Delta S_T^\ddagger = \Delta S_m^\ddagger + \Delta c_p \ln \left(\frac{T}{T_m} \right), \quad (4)$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatia S., Lauster D., Bardua M., Ludwig K. Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection *in vitro* and *in vivo* // *Biomaterials*. 2017. Vol. 138. P. 22–34.
2. Sundararajana A., Ganapathya R., Huana L., Dunlapb J. Influenza virus variation in susceptibility to inactivation by pomegranate polyphenols is determined by envelope glycoproteins // *Antiviral*. 2010. Vol. 88. N 1. P. 1–9.
3. Tuladar E., Bouwknecht M., Zwietering M.H., Koopmans M., Duizer E. Thermal stability of structurally

где ΔS_T^\ddagger – изменение активационной энтропии для температуры T , ΔS_T^\ddagger – изменение активационной энтропии для температуры T_m , $T_m = 334$ К.

По графическим зависимостям уравнения (4) ΔS_T^\ddagger от T были определены значения инкремента молярной теплоемкости Δc_p как угловые коэффициенты уравнений линейной аппроксимации. Полученные значения Δc_p отрицательны и равны: $\Delta c_{p1} = -1,14 \pm 0,08$ кДж/К·моль и $\Delta c_{p2} = -0,44 \pm 0,06$ кДж/К·моль для термоинактивации ГА и инфекционного титра вируса гриппа соответственно. Отрицательные значения инкремента молярной теплоемкости для термоинактивации ГА вируса указывают на наличие перехода «клубок-дегидратированная расплавленная глобула» [7] в присутствии 30 мкМ ПАА. Полученные данные соответствуют значениям активационной энтропии для термоинактивации ГА вируса.

Борьба с пандемиями гриппа и других респираторных оболочечных вирусов, в том числе COVID-19, требует разработки новых методов профилактики острых респираторных вирусных инфекций, в том числе химиопрепаратов, оказывающих инактивирующее действие на все антигенные белки вируса. Отдельного внимания заслуживает одновременное применение физических и химических факторов инактивации вирусов. Полученные нами результаты показывают, что использование ПАА в совокупности с повышенной температурой вызывает эффективную и достаточно быструю инактивацию вируса гриппа, при этом используемый ПЭ оказывает инактивирующее действие в отношении всех поверхностных гликопротеинов вириона. Применение ПАА совместно с температурной инактивацией вируса может найти применение в технологии получения инактивированных, в том числе инактивированных цельновирионных вакцин против гриппа.

Работа выполнена в рамках программы «Russian Academic Excellence Project 5-1». Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

different viruses with proven or potential relevance to food safety // *J. Appl. Microbiol.* 2012. Vol. 112. N 5. P. 1050–1057.

4. Wang W., Song H.S., Keller P.W., Alvarado-Facundo E., Vassell R., Weiss C.D. Conformational stability of the hemagglutinin of H5N1 influenza A viruses influences susceptibility to broadly neutralizing stem antibodies // *J. Virol.* 2018. Vol. 92. N 12: e00247-18.

5. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной

активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа // *Вопр. вирусол.* 2015. Т. 60. № 4. С. 5–9.

6. Joly M. A physico-chemical approach to the denaturation of proteins. L.; N.Y.: Academic Press, 1965. 350 pp.

7. Потехин С.А. Сканирующая микрокалориметрия при высоком давлении – новый метод исследования конформационных и фазовых // *Усп. биол. хим.* 2018. Т. 58. С. 285–312.

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65. N.1–2. P. 55–63.

9. Wegmann T.G., Smithies O. Improvement of the microtiter hemagglutination // *Method. Transfusion.* 1966. Vol. 8. N. 1. P. 67–73.

10. Pleshka S., Stein M., Schoop R., Hudson J.B. Antiviral properties and more of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV) // *Virolog. J.* 2009. Vol. 6: 197.

11. Payne A.F., Binduga-Gajewska I., Kauffman E.B., Kramer L.D. Antiviral activity of binase against the pandemic influenza A (H1N1) virus // *J. Virol. Meth.* 2006. Vol. 134. N. 1–2. P. 183–189.

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 21.01.2021 г.

Принята в печать 02.02.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Thermoinactivation kinetics of strain A/BANGKOK/1/1979(H3N2) influenza virus in the presence of polyallylamine

N.A. Kontarov^{1,2,*} , E.I. Dolgova² , E.O. Kontarova³ ,
I.V. Pogarskaya² , N.V. Yuminova² 

¹*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya ul. 8–2, Moscow, 119991, Russia;*

²*I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Malyy Kazenny per. 5a, Moscow, 115088, Russia;*

³*Federal Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, Orekhovy bulv. 28, Moscow, 115682, Russia*

*e-mail: kontarov@mail.ru

Currently, an increasing place in antiviral therapy given to various polyelectrolytes. For polyelectrolyte polyallylamine with a molecular weight of 6000 Da, antiviral activity shown against influenza viruses, measles, herpes simplex type 1 and cytomegalovirus. A non-toxic concentration of 30 was determined, at which the antiviral effect for measles and flu is preserved, but there is no toxic effect on cells. At the same time, it known that the simultaneous effect of physical environmental factors and chemical compounds on the virus contributes to a more pronounced decrease in the infectivity of the virus. One of these physical factors is the temperature, the effect of which on the virus leads to its inactivation. The study of thermal inactivation parameters is of great practical importance in the development of influenza vaccines, as well as for studying the decrease in the infectious activity of viral particles when they settle on various surfaces. In this connection, it is of particular interest to study the kinetic and thermodynamic characteristics of the process of thermal inactivation of the influenza virus in the presence of the antiviral compound polyallylamine. In this paper, we have shown that the process of thermal inactivation of the influenza virus in the presence of polyallylamine in the temperature range 38–60°C described by the first-order reaction kinetics. Thermodynamic parameters of thermal inactivation indicate the involvement of surface proteins of the influenza virus in the process of inactivation as result of the interaction of polyallylamine with them. The results obtained indicate the possibility of using polyallylamine as a compound that accelerates the process of thermal inactivation of the influenza virus.

Keywords: *polyelectrolyte, polyallylamine, influenza virus, thermal inactivation, hemagglutinating activity, viral infectivity*

Funding: The research was performed within the framework of the “Russian Academic Excellence Project 5-1” program.

Сведения об авторах

Контаров Николай Александрович – канд. биол. наук, доц. кафедры медицинской и биологической физики лечебного факультета первого МГМУ имени И.М. Сеченова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: kontarov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0030-4867>

Долгова Екатерина Игоревна – мл. науч. сотр. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: doc.ekaterina.dolgova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8985-7569>

Контарова Елена Олеговна – канд. мед. наук, врач лабораторной диагностики Федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства (Больница №83). Тел.: 8-499-725-44-40; e-mail: kontarova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3580-6277>

Погарская Ирина Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: kozur_i_v@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5550-7875>

Юминова Надежда Васильевна – докт. биол. наук, зав. лаборатории детских вирусных инфекций отдела вирусологии НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-499-674-01-99; e-mail: yuminova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7723-4038>

ERRATUM

Исправление в статье “Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях”**Г.В. Моргунова¹** 

Исправление в статье:

Моргунова Г.В. Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях // Вест. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2020. Т. 75. № 4. С. 237–243.**Страница** – 238**Колонка** – правая**Раздел** – Лактат: ядовитый метаболит или источник углерода**Строка** – 3-я сверху**Напечатано**Одной из причин его накопления является эффект Варбурга [39], или **анаэробный** гликолиз.**Следует читать**Одной из причин его накопления является эффект Варбурга [39], или **аэробный** гликолиз.Исходную статью можно найти на сайте журнала – <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/933>

¹ Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

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, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» 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 «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных Elibrary.ru, ВИНИТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, а английская – в Scopus, Google Scholar, CAB International, Academic OneFile, CAB Abstracts, Gale, Global Health, Health Reference Center Academic, OCLC и Summon by Serial Solutions и др.

Желающим 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 «Pleiades Publishing». 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. 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) и Word 2007 (*.docx), 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 3500 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), в сноске на первой странице указывается 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 (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

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).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию....», где позднее ответственный секретарь редколлегии укажет 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).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;

² Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

*e-mail: kolosova@mail.ru

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке.

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

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 (после сведений об авторах). 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 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). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого, его смысл не терялся и все элементы были отличимы.

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 рецензируемые 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 (*если редактора два, то между ними ставится и/and*). 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 (*Sidorov S.S., Ivanov I.I., Petrov P.P. 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 – N.Y. 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 cytogerontology // *Mech. Ageing Dev.* 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

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

Книга:

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

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., Gavrilov 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. Авторам необходимо предложить 2–3 потенциальных рецензентов для своей статьи (предложенные кандидаты не должны иметь с авторами совместных публикаций и не должны работать в той же организации, где работают авторы). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также 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.