

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 76 • № 2 • 2021 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Шумов Д.Е., Ткаченко О.Н., Яковенко И.А., Дорохов В.Б.
Стационарный слуховой ответ на музыку на основе бинауральных биений
во время дневного сна 55
- Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А.
Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака
натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей 61
- Новиков Р.В., Грибкова А.К., Качер Ю.Г., Зайцев П.А., Армеев Г.А.,
Глухов Г.С., Шайтан А.К. Дизайн биосенсоров нуклеиновых кислот
на основе систем CRISPR/Cas и репортерных сплит-белков 67
- Подунай Ю.А., Давидович О.И., Давидович Н.А.
Репродуктивная совместимость европейских популяций
у двух видов *Ulnaria* (Bacillariophyta) 76
- Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Калиевые токи входящего выпрямления
 I_{K1} и I_{KACH} в рабочем миокарде японского перепела (*Coturnix japonica*) 83

Краткие сообщения

- Осмоловский А.А., Шмидт Л., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А.,
Егоров Н.С. Воздействие протеиназы *Aspergillus fumigatus*
на белки плазмы крови 90

CONTENTS

Research articles

Shumov D.E., Tkachenko O.N., Yakovenko I.A., Dorokhov V.B. Auditory steady state response to the music with embedded binaural beats during daytime sleep 55

Ivanova E.A., Matyushkin A.I., Vasilchuk A.G., Voronina T.A.
Ability of mexidol to enhance antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema. 61

Novikov R.V., Gribkova A.K., Kacher J.G., Zaytsev P.A., Armeev G.A., Gluhov G.S., Shaytan A.K. Design of nucleic acid biosensors based on CRISPR/Cas systems and reporter split-proteins. 67

Podunay Y.A., Davidovich O.I., Davidovich N.A. Reproductive compatibility of European populations of two species of *Ulnaria* (Bacillariophyta) 76

Filatova T.S., Abramochkin D.V. Inward rectifier currents I_{K1} and I_{KACh} in working myocardium of Japanese quail (*Coturnix japonica*). 83

Short communications

Osmolovsky A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Effect of *Aspergillus fumigatus* proteinases on blood plasma proteins 90

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.821.7

**Стационарный слуховой ответ на музыку
на основе бинауральных биений во время дневного сна****Д.Е. Шумов* , О.Н. Ткаченко, И.А. Яковенко, В.Б. Дорохов***Лаборатория нейробиологии сна и бодрствования, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии,
Российская академия наук, Россия, 117485, г. Москва, ул. Бултерова, д. 5а***e-mail: dmitry-shumov@yandex.ru*

Музыка на основе бинауральных биений (ББ) является одним из перспективных средств неинвазивной терапии инсомнии. В работе проверялась гипотеза о резонансном механизме воздействия такой музыки на ритмы электроэнцефалограммы человека как физиологическом механизме улучшения сна. В группе из 21 испытуемого сравнивали спектр стационарного слухового ответа в процессе засыпания в сопровождении музыки на основе ББ с частотами 2 Гц и 4 Гц (стимул) и в отсутствие стимула (контроль). Для этих двух условий обнаружены достоверные различия мощности стационарного слухового ответа на частоте ЭЭГ 14 Гц (частота «сонных веретен»). Однако на частотах 2 Гц и 4 Гц, которые, согласно гипотезе, должны придавать сомногенный эффект музыкальному стимулу, достоверных различий не обнаружено. Полученные результаты не поддерживают гипотезу о резонансном воздействии исследованного стимула на сон, но подтверждают сделанный в предыдущей работе авторов вывод о том, что он улучшает качество дневного сна.

Ключевые слова: бинауральные биения, дневной сон, засыпание, музыка, навязывание ритма, стационарный слуховой ответ, инсомния

Музыка является одним из эффективных методов терапии инсомнии, набирающим популярность в последние годы благодаря отсутствию у нее побочных эффектов [1–3].

Согласно опросам [4] примерно 25% людей используют музыку в качестве средства, облегчающего засыпание. Влиянию музыки на процесс сна посвящены научные обзоры [3, 5–8]. В последнем из них выделены 6 возможных причин (гипотез) улучшения сна посредством прослушивания музыки: расслабление, отвлечение, эффект резонанса, эффект маскировки неблагоприятного звукового фона, приятные эмоциональные ассоциации, культурные ожидания.

Третья из приведенных гипотез («эффект резонанса»), которую можно рассматривать как частный случай более широкой гипотезы под названием «brainwave entrainment», подразумевает резонансное взаимодействие ритмического компонента музыки с ритмами электроэнцефалограммы (ЭЭГ) мозга и, как следствие, предсказуемое воздействие на уровень бодрствования человека. Обычно в музыке используется сравнительно медленный ритм, который не превышает по частоте верхнюю границу дельта-ритма ЭЭГ 4 Гц, характерного для медленноволнового сна. Поэтому в соответствии с вышеупомянутой гипотезой ритмичная музыка может быть неинвазивным средством улучшения сна. Ритм музыки

может быть явным, например, при наличии активной партии ударных инструментов, или неявным, как у музыки на основе бинауральных биений (ББ). ББ представляют собой психоакустическую иллюзию пульсации звука, возникающую при предъявлении раздельно в правое и левое ухо двух несильно отличающихся по частоте (примерно до 30 Гц) монотонных акустических сигналов. Например, если один из сигналов имеет частоту 200 Гц, а другой — 204 Гц, то будут ощутимы биения с частотой 4 Гц. В отличие от обычных акустических, или моноауральных, биений (далее — МБ), у ББ отсутствует физический носитель. Привлекательность звуковых стимулов на основе ББ для терапии нарушений сна заключается в том, что человек может ощутить их воздействие при очень малой громкости звука, по сути граничащей с порогом слуха [9], т.е. такой стимул создает мало помех для сна. Но воздействие ББ на сон изучено недостаточно; особенно это касается объективных исследований, выполненных на основе анализа физиологических параметров, — ЭЭГ и электрокардиограммы. На данный момент можно найти считанные работы, удовлетворяющие этим требованиям [10–13].

У вышеупомянутой гипотезы «резонанса» есть недостатки. Нетрудно заметить, что она состоит из двух связанных предположений, первое из которых — частный случай эффекта, хорошо извест-

ного как «навязывание ритма ЭЭГ» под воздействием периодических сенсорных стимулов. Возможность навязывания ритма ЭЭГ с помощью паттернов, используемых в музыке, показана в одной из работ [14]. Однако эффективность усвоения ритма — в данном случае, музыкального — может сильно отличаться для разных условий опыта. В каких-то условиях ритм может совсем не усваиваться, в каких-то — усваиваться хорошо, и эти условия остаются предметом исследований. Это первый недостаток.

Кроме того, изменения в спектре ЭЭГ вследствие усвоения ритма могут быть не только на частоте стимула. Они могут иметь место и на других резонансных частотах спектра ЭЭГ, которые совсем не характерны для сна, поскольку выходят за пределы требуемого тета- и дельта-диапазона (т.н. «кросс-частотный» эффект ББ [15, 16]). Соответственно, улучшения сна в результате усвоения ритма не произойдет. Это второй недостаток.

В силу вышесказанного, область применимости гипотезы «резонанса» — по крайней мере, для звуковых стимулов, предъявляемых во сне — на данный момент не ясна. Например, в одном пилотном исследовании [10] показано, что латентность 2-й стадии сна при засыпании в сопровождении монотонного звука с ББ ниже, чем при засыпании в сопровождении идентичного звука, но с МБ. Этот факт сложно объяснить с позиций «навязывания ритма», поскольку усвоение ритма от ББ хуже, чем от МБ [15, 17]. С другой стороны, есть исследование воздействия ББ 3 Гц на 3-ю стадию медленного сна, результаты которого вполне объяснимы «навязыванием ритма» [11].

Настоящее исследование посвящено проверке частного случая гипотезы «резонанса», связанного с воздействием на дневной сон скрытого ритма музыки в виде медленных ББ — 2 Гц и 4 Гц, — соответствующих дельта-ритму ЭЭГ. В качестве ритмической основы музыки были выбраны именно ББ, а не МБ, поскольку согласно некоторым данным [10] такая стимуляция более эффективно снижает латентность сна. Для проверки гипотезы была выбрана методика анализа стационарного слухового ответа (ССО, англ. ASSR — «Auditory Steady State Response»). ССО представляет собой приборно регистрируемый (с помощью ЭЭГ или магнитоэнцефалограммы) ответ мозга на частотно-специфические звуковые стимулы, непрерывно звучащие в течение достаточно длительного промежутка времени; при этом составляющие частотные компоненты стимулов должны оставаться постоянными по амплитуде и фазе [18]. В случае сложного стимула, например, биений, ССО повторяет их огибающую и таким образом влияет на фоновую ЭЭГ-активность [19]. В отличие от обычных слуховых вызванных потенциалов, для описания которых используются

параметры амплитуды и латентности отдельных их компонентов, в случае ССО принято использовать амплитудно-частотные и фазовые характеристики спектра. Чаще всего данная методика применяется в отоларингологии, поскольку позволяет объективно оценить слуховую чувствительность как у людей с нормальным слухом, так и с различными его нарушениями.

Материалы и методы

Экспериментальная группа состояла из 21-го студента медицинского университета (12 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 до 22 лет; средний возраст $20,1 \pm 0,7$ года). С каждым участником было подписано информированное согласие на участие в эксперименте. Исследование соответствовало этическим нормам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и одобрено этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

В качестве музыкального стимула была взята авторская (написанная на заказ) электронная композиция длительностью 20 мин с наложенными ББ 4 Гц и 2 Гц. Из этого времени звучания первые 19 мин были «запрограммированы» для засыпания, а оставшееся время — для быстрого пробуждения. Биения были наложены от начала фонограммы и по 19-ю мин включительно блоками длительностью 64 с. 20-я мин — без наложения ББ (табл. 1).

Таблица 1

Расписанные по 64-секундным блокам параметры наложения бинауральных биений (ББ) на музыку. В средней части фонограммы, когда предполагалось снижение уровня бодрствования, амплитуда несущего тона снижена на 3 дБ. Начиная с 12-й мин, добавлены блоки ББ 2 Гц для углубления сна.

Номер блока	Несущая частота ББ, левый/правый канал
1	330 / 334 Гц
2	440 / 444 Гц
3	330 / 334 Гц
4	440 / 444 Гц
5	330 / 334 Гц
6	440 / 444 Гц
7	330 / 334 Гц (-3 дБ)
8	440 / 444 Гц (-3 дБ)
9	330 / 334 Гц (-3 дБ)
10	220 / 224 Гц (-3 дБ)
11	165 / 167 Гц (-3 дБ)
12	220 / 224 Гц (-3 дБ)
13	165 / 167 Гц (-3 дБ)
14	220 / 224 Гц (-3 дБ)
15	165 / 167 Гц (-3 дБ)
16	220 / 224 Гц (-3 дБ)
17	165 / 167 Гц (-3 дБ)
18	220 / 224 Гц

Каждый испытуемый участвовал в двух опытах, в одном из которых он засыпал под музыку (стимуляция), а в другом — без нее, в тишине (контроль). Порядок опытов был контрбалансирован по выборке; при этом, в результате случайного выбора, у 13 человек из 21 первым по порядку шел «контроль». Эксперименты проводили в дневное время, с 13 до 16 ч, с промежутком между двумя опытами не более 15 сут.

Стимул предъявляли через полноразмерные стереонаушники Bose QC-25 (чувствительность 97 дБ, сопротивление 32 Ом) с отключенной системой активного шумоподавления. Громкость звука в каждом опыте подбирали в зоне индивидуального комфорта; она составляла от 55 до 57 дБ уровня звукового давления (*англ.* dB SPL).

Испытуемый находился в звукоизолированном светозащищенном помещении при стабильной температуре 24°C. В течение опыта регистрировали полисомнограмму (ПСГ) в составе 16 каналов ЭЭГ, подключенных по схеме 10–20 с 2 референтными электродами на правой и левой мастиоидных костях, а также по одному каналу электрокардиограммы и электроокулограммы. Регистрацию вели при помощи беспроводного аппаратно-программного комплекса «Нейрополиграф 24» (ПО «Нейротех», Таганрог, Россия) с частотой дискретизации 500 Гц и с использованием высоко-, низкочастотного и режекторного фильтров (0,5 Гц, 35 Гц, и 50 Гц соответственно).

После наложения электродов испытуемый располагался на кушетке и первые 15 мин находился в горизонтальном положении с открытыми глазами. При этом следили, чтобы он не засыпал. Затем давали команду закрыть глаза и 3 мин вели фоновую регистрацию ПСГ. Далее включали музыку, а спустя 21 мин, по окончании музыки, испытуемого будили (если он заснул) и записывали еще 3 мин фона с закрытыми глазами.

В контрольных опытах схема эксперимента была идентичной за исключением того, что стимул не предъявляли, а испытуемый находился 21 мин в тишине.

Для вычисления ССО была использована процедура, аналогичная описанной в работе [15]. На ЭЭГ испытуемых — как контрольных, так и с предъявлением стимула — выделяли отрезок записи, начиная с 20-й с после начала музыки и до начала 20-й мин. Этот отрезок на каждой ЭЭГ был разбит на интервалы длительностью 1 с соответствующими метками, из которых, после визуального анализа, вручную были удалены интервалы с артефактами. В качестве источника сигнала были выбраны отведения ЭЭГ С3 и С4, поскольку они являются стандартными в сомнологических исследованиях и позволяют оценивать активность как передних, так и задних областей головного мозга. Сигнал ЭЭГ в отведениях С3 и С4 был дополнительно отфильтрован в диапазоне от 1 до

20 Гц и, при помощи последовательности команд в пакете Matlab, над ним произведены следующие операции:

1. Амплитудное усреднение безартефактных односекундных ЭЭГ-интервалов.
2. Вычисление с помощью дискретного преобразования Фурье, после линейного детрендинга, для каждого целого значения частоты ЭЭГ (переменная f) в диапазоне от 2 до 20 Гц амплитуды $A(f)$ спектра ЭЭГ в отведениях С3 и С4 — для всех 42 получившихся в п. 1 усреднений длительностью 1 с (21 испытуемый $\times$ 2 опыта).
3. Вычисление для каждого из 19 значений частоты f относительной мощности $P_{отн}(f)$ как отношения квадрата соответствующего коэффициента Фурье $A^2(f)$ к средней мощности сигнала ЭЭГ на 3-минутном фоновом участке записи $\langle P_{фон} \rangle$. Эту среднюю мощность вычисляли как сумму квадратов коэффициентов дискретного преобразования Фурье (п. 2 выше) сигнала, полученного усреднением (п. 1 выше) односекундных интервалов, на которые был разбит 3-минутный фоновый участок ЭЭГ, за вычетом интервалов с артефактами:

$$P_{отн}(f) = A^2(f) / \langle P_{фон} \rangle,$$
$$\text{где } \langle P_{фон} \rangle = \sum_{i=2}^{20} (A^2(i)_{фон}) / N; N = 19.$$

Результаты и обсуждение

ПСГ испытуемых были визуально стадированы по критериям Американской академии медицины сна [20] с эпохой 30 с. Все испытуемые в серии со стимуляцией засыпали (на гипнограмме присутствовала по меньшей мере, 1-я стадия сна), а в контрольной серии у одного испытуемого признаков сна не было. В табл. 2 приведено сравнение средних значений показателей сна при стимуляции и в контрольной серии. Средняя длительность 1-й стадии сна при стимуляции значимо снижалась (t -критерий Стьюдента с уровнем значимости $p = 0,015$).

Таблица 2

Сравнение общих показателей дневного сна в условиях стимуляции и в контроле в исследованной группе испытуемых (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, мин). Длительность 2-й и 3-й стадий сна указана суммарно, т.к. ввиду малой длительности опыта 3-я стадия наблюдалась не у всех испытуемых. Звездочкой и полужирным шрифтом обозначены достоверные различия ($p < 0,05$).

Показатели сна	Стимул	Контроль
Общее время сна	14,52 $\pm$ 0,70	13,52 $\pm$ 1,24
Латентность 1-й стадии сна	3,79 $\pm$ 0,51	4,12 $\pm$ 1,11
Длительность 1-й стадии сна	5,95 $\pm$ 0,81*	7,60 $\pm$ 1,01*
Длительность 2-й и 3-й стадий сна	8,57 $\pm$ 1,10	5,93 $\pm$ 1,38

Для сравнения спектров ССО в условиях стимуляции и контроля для каждого целого значения частоты ЭЭГ (переменная f) в диапазоне от 2 до

20 Гц была сформулирована нулевая гипотеза об отсутствии различий между соответствующими значениями относительной мощности спектра — $P_{\text{отн}}(f)$, — полученными в контрольных условиях, и аналогичными значениями, полученными в условиях стимула (музыки). Гипотеза была проверена с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента для зависимых выборок после логарифмического преобразования значений $P_{\text{отн}}(f)$. Логарифмическое преобразование применено для придания данным распределения, близкого к нормальному. Кроме того, в данном случае оно отражает физиологические особенности оценки мозгом громкости звука, которую выражают логарифмом относительного звукового давления (децибелл). Уровень отклонения нулевых гипотез был принят $p < 0,05$.

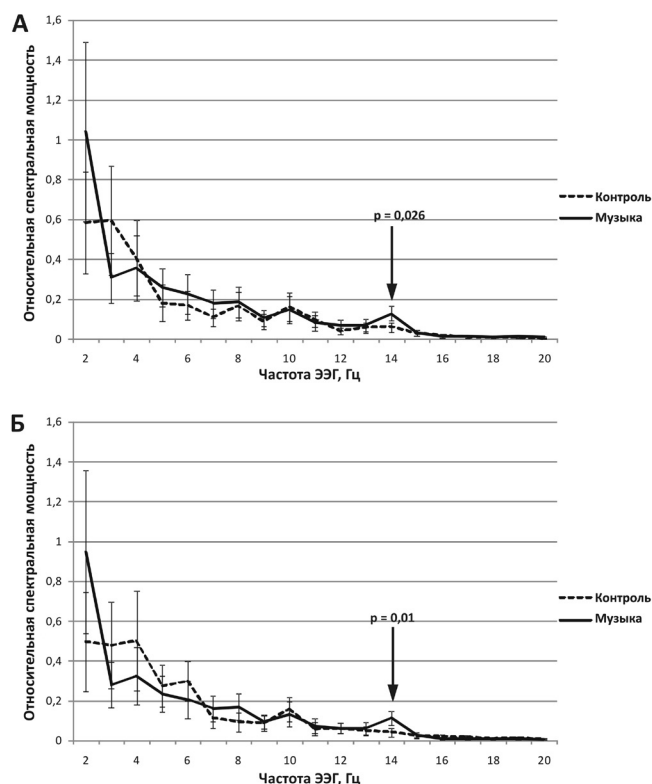


Рисунок. Зависимость относительной спектральной мощности стационарного слухового ответа (ССО) от частоты ЭЭГ для отведений С3 (А) и С4 (Б). По оси абсцисс отложена частота ЭЭГ от 2 Гц до 20 Гц (переменная f); по оси ординат — усредненное по всем испытуемым (геометрическое среднее) значение относительной спектральной мощности ССО — $P_{\text{отн}}(f)$ (формулу расчета см. в тексте). Планки погрешностей соответствуют доверительному интервалу 95% ($p=0,05$). Стрелками показаны достоверные различия между условиями стимула и контроля на частоте 14 Гц. Для остальных частот исследованного диапазона ЭЭГ различия $P_{\text{отн}}(f)$ недостоверны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trahan T., Durrant S.J., Müllensiefen D., Williamson V.J. The music that helps people sleep and the reasons they believe it works: A mixed methods analysis of online survey reports // PLoS One. 2018. Vol. 13. N 11: e0206531.
2. Picard L.M., Bartel L.R., Gordon A.S., Cepo D., Wu Q., Pink L.R. Music as a sleep aid in fibromyalgia // Pain Res. Manag. 2014. Vol. 19. N 2. P. 97–101.

Статистический анализ показал значимое увеличение $P_{\text{отн}}$ на частоте 14 Гц в ЭЭГ-отведениях С3 и С4 в условиях стимуляции по сравнению с контролем (рисунок). Можно предположить, что это вызвано увеличением числа и амплитуды т.н. «сонных веретен», свойственных 2-й и 3-й стадиям сна, поскольку в исследованной возрастной группе наиболее вероятная спектральная частота «сонных веретен» составляет именно 14 Гц. Для остальных частот ЭЭГ от 2 до 20 Гц достоверных различий $P_{\text{отн}}$ между условиями стимуляции и контроля не наблюдалось. Это относится, в том числе, к частотам 2 Гц и 4 Гц, заложенным в музыкальный стимул в виде ББ, что означает отсутствие предполагаемого резонансного воздействия данного стимула на ЭЭГ.

Таким образом, полученный результат не подтверждает упомянутую в начале статьи «гипотезу резонанса» как лежащую в основе механизма улучшения сна с помощью музыки на основе ББ. Однако в пользу данной гипотезы свидетельствуют результаты другой работы [14]. Расхождение можно объяснить низкой ощущаемой глубиной модуляции ББ [9] по сравнению с использованной в упомянутой работе [14] амплитудной модуляцией МБ. Также следует учесть невысокую, по сравнению с данными этой работы [14], громкость стимула (музыки), использованного в нашем исследовании, ограниченную во избежание пробуждающего эффекта.

С другой стороны, полученные результаты подтверждают вывод, сделанный в одной из наших работ [13], о том, что исследованная комбинация музыки и ББ улучшает качество дневного сна, поскольку наблюдаемое увеличение спектральной мощности ЭЭГ на частоте «сонных веретен» свидетельствует об увеличении доли 2-й и 3-й стадии сна. Это показывает и непосредственное сравнение длительности стадий: под влиянием стимула произошло перераспределение общего времени сна в сторону более глубоких его стадий (2-й и 3-й) за счет уменьшения длительности 1-й стадии.

Исследование выполнено на средства государственного бюджета (№АААА-А17-117092040002-6) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-013-00747а). Работа проведена с соблюдением этических норм и одобрено этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

3. Jespersen K.V., Koenig J., Jennum P., Vuust P. Music for insomnia in adults // Cochrane Db. Syst. Rev. 2015. N 8: CD010459.

4. Morin C.M., LeBlanc M., Daley M., Gregoire J.P., Merette C. Epidemiology of insomnia: prevalence, self-help treatments, consultations, and determinants of help-seeking behaviors // Sleep Med. 2006. Vol. 7. N 2. P. 123–130.

5. De Niet G., Tiemens B., Lendemeijer B., Hutschemaekers G. Music-assisted relaxation to improve sleep quality: meta-analysis // *J. Adv. Nurs.* 2009. Vol. 65. N 7. P. 1356–1364.
6. Feng F., Zhang Y., Hou J., Cai J., Jiang Q., Li X., Zhao Q., Li B.-A. Can music improve sleep quality in adults with primary insomnia? A systematic review and network meta-analysis // *Int. J. Nurs. Stud.* 2018. Vol. 77. P. 189–196.
7. Wang C.-F., Sun Y.-L., Zang H.-X. Music therapy improves sleep quality in acute and chronic sleep disorders: a meta-analysis of 10 randomized studies // *Int. J. Nurs. Stud.* 2014. Vol. 51. N 1. P. 51–62.
8. Dickson G.T., Schubert E. How does music aid sleep? Literature review // *Sleep Med.* 2019. Vol. 63. P. 142–150.
9. Oster G. Auditory beats in the brain // *Sci. Am.* 1973. Vol. 229. N 4. P. 94–103.
10. Shumov D.E., Arsen'ev G.N., Sveshnikov D.S., Dorokhov V.B. Comparative analysis of the effect of stimulation with a binaural beat and similar kinds of sounds on the falling asleep process: A brief note // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 1. P. 33–36.
11. Jirakittayakorn N., Wongsawat Y. A novel insight of effects of a 3-Hz binaural beat on sleep stages during sleep // *Front. Hum. Neurosci.* 2018. Vol. 12: 387.
12. Shumov D.E., Yakovenko I.A., Dorokhov V.B., Sveshnikov D.S., Yakunina E.B., Bakaeva Z.V., Vinokurov V.A., Putilov A.A. Napping between Scylla and Charybdis of N1 and N3: latency to N2 in a brief afternoon nap can be reduced by binaural beating // *Biol. Rhythm. Res.* 2021. Vol. 52. N 2. P. 227–236.
13. Шумов Д.Е., Яковенко И.А., Алипов Н.Н., Бакаева З.В., Якунина Е.Б., Минюк А.Н., Винокуров А.В., Дорохов В.Б. Влияние музыки, содержащей бинауральные биения, на динамику дневного засыпания // *Журн. неврол. психиатр. им. С.С. Корсакова.* 2020. Т. 120. № 2. С. 39–44.
14. Nozaradan S., Peretz I., Missal M., Mouraux A. Tagging the neuronal entrainment to beat and meter // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. N 28. P. 10234–10240.
15. Perez H.D.O., Dumas G., Lehmann A. Binaural Beats through the auditory pathway: from brainstem to connectivity patterns // *Eneuro.* 2020. Vol. 7. N 2: ENEURO.0232-19.2020
16. Gao X., Cao H., Ming D., Qi H., Wang X., Wang X., Chen R., Zhou P. Analysis of EEG activity in response to binaural beats with different frequencies // *Int. J. Psychophysiol.* 2014. Vol. 94. N 3. P. 399–406.
17. Pratt H., Starr A., Michalewski H.J., Dimitrijevic A., Bleich N., Mittelman N. A comparison of auditory evoked potentials to acoustic beats and to binaural beats // *Hearing Res.* 2010. Vol. 262. N 1–2. P. 34–44.
18. Наумова И.В., Гадалева С.В., Пашков А.В. Стационарные слуховые потенциалы. Обзор литературы // *Росс. оториноларингол.* 2018. № 3. С. 115–129.
19. Picton T.W., John M.S., Dimitrijevic A., Purcell D. Human auditory steady-state responses: Respuestas auditivas de estado estable en humanos // *Int. J. Audiol.* 2003. Vol. 42. N 4. P. 177–219.
20. Berry R.B., Brooks R., Gamaldo C.E., Harding S.M., Lloyd R.M., Marcus C.L., Vaughn B.V. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, terminology and technical specifications, Version 2.2. www.aasmnet.org. Darien, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2015.

Поступила в редакцию 15.08.2020 г.

После доработки 17.02.2021 г.

Принята в печать 08.04.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Auditory steady state response to the music with embedded binaural beats during daytime sleep

D.E. Shumov* , O.N. Tkachenko, I.A. Yakovenko, V.B. Dorokhov

Laboratory of Sleep/Wake Neurobiology, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Butlerova ul. 5A, 117485, Moscow, Russia

*e-mail: dmitry-shumov@yandex.ru

Music with embedded binaural beats (BBs) is promising non-invasive tools for insomnia treatment. This work tests the hypothesis of “entrainment” effect of that kind of music on human EEG rhythm as physiological mechanism of sleep improvement. The spectrum of auditory steady state response has been compared in the group of 21 subjects during daytime sleep onset, with music embedded with BBs of 2 Hz and 4 Hz (stimulus condition) and without any stimulus (control condition). Significant difference in auditory steady state response power has been found between conditions at 14 Hz (“sleep spindle” frequency). However, no significant difference has been found at frequencies 2 Hz and 4 Hz embedded to add somnogenic feature to the music stimulus according to hypothesis tested. The results obtained do not support the hypothesis of “entrainment” effect of the stimulus examined on sleep; yet they support conclusion made in the previous authors’ paper that it improves daytime sleep quality.

Keywords: *binaural beats, daytime sleep, falling asleep, music, neural entrainment, auditory steady state response, insomnia*

Funding: This study was performed under the state assignment of Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, project number AAAA-A17-117092040002-6, and was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 19-013-00747a.

Сведения об авторах

Шумов Дмитрий Ефимович — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории нейробиологии сна и бодрствования Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-72-00; e-mail: dmitry-shumov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5755-5563>

Ткаченко Ольга Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории нейробиологии сна и бодрствования Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-72-00; e-mail: tkachenkoon@gmail.com

Яковенко Ирина Анатольевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории нейробиологии сна и бодрствования Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-72-0; e-mail: irinayakovenko@mail.ru

Дорохов Владимир Борисович — докт. биол. наук, зав. лабораторией нейробиологии сна и бодрствования Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тел.: 8-495-334-72-00; e-mail: vbzorokhov@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 615.017

Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей**Е.А. Иванова* , А.И. Матюшкин , А.Г. Васильчук , Т.А. Воронина **

*Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова,
Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) — одна из наиболее востребованных фармакотерапевтических групп. Однако их прием может вызывать многочисленные побочные эффекты, поэтому разработка подходов применения этих препаратов, направленных на снижение выраженности побочных эффектов НПВП, является актуальной задачей. **Целью настоящего исследования** было изучение влияния мексидола на выраженность противовоспалительного действия двух НПВП: селективного ингибитора циклооксигеназы-2 эторикоксиба и неселективного ингибитора циклооксигеназы диклофенака натрия. **Материалы и методы:** Действие препаратов при однократном пероральном введении оценивали на моделях каррагенанового отека лапы у крыс и мышей, регистрируя его выраженность в течение 4 и 6 ч соответственно. **Результаты:** Диклофенак натрия в дозах 1 и 10 мг/кг оказывает дозозависимое антиэкссудативное действие, эффект эторикоксиба в этих дозах сопоставим, тогда как мексидол в дозе 25 мг/кг эффекта не вызывает. Комбинация диклофенака натрия (1 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг) на модели каррагенанового отека у мышей по выраженности эффекта не уступает диклофенаку натрия в дозе 10 мг/кг и превосходит диклофенак натрия в дозе 1 мг/кг. На модели каррагенанового отека у крыс комбинация диклофенака натрия с мексидолом статистически значимо снижает выраженность отека через 4 ч после его индукции по сравнению с введением только НПВП в дозе 1 мг/кг. Комбинация эторикоксиба (1 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг) на модели каррагенанового отека у мышей обладает большей эффективностью, чем эторикоксиб в дозах 1 и 10 мг/кг. На модели каррагенанового отека у крыс эторикоксиб в дозе 10 мг/кг и комбинация эторикоксиба (1 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг) вызывают сходный эффект. **Заключение:** Мексидол в малой дозе (25 мг/кг) обладает способностью усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба, и, следовательно, уменьшение дозы НПВП в комбинации с мексидолом будет способствовать снижению нежелательных побочных эффектов этих препаратов.

Ключевые слова: мексидол, диклофенак натрия, эторикоксиб, экссудативное воспаление, каррагенановый отек, крысы, мыши

При воспалении повышается проницаемость сосудов, повреждаются клетки эндотелия сосудов, происходит интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активация мембранных фосфолипаз. Окисление липопротеинов низкой плотности приводит к образованию окисленных липидов и липопротеинов, обладающих иммуногенными и провоспалительными свойствами [1]; фрагменты, характерные для окисленных липопротеинов низкой плотности, распознаются сквэнджер-рецепторами макрофагов и участвуют в реакциях врожденного иммунитета [2].

Под действием фосфолипазы A2 из фосфолипидов образуются жирные кислоты, в частности — арахидоновая, и лизофосфолипиды [3], которые,

наряду с продуктами свободнорадикального окисления, повышают проницаемость мембран клеток для ионов и воды. Повреждение тканей приводит к индукции циклооксигеназы (ЦОГ), катализирующей образование обеспечивающих развитие воспалительной реакции простагландинов из арахидоновой кислоты [4, 5].

Ингибиторы ЦОГ зарекомендовали себя как наиболее широко используемые противовоспалительные и болеутоляющие лекарственные средства. Однако и селективные ингибиторы ЦОГ-2, которой принадлежит основная роль в развитии воспаления, и неселективные ингибиторы ЦОГ, включая ЦОГ-1, часто инициирующую воспалительный процесс, вызывают много-

численные побочные эффекты, обусловленные угнетением продукции участвующих в разнообразных физиологических функциях простатогландинов [6–11].

В связи с вышеизложенным препараты, обладающие антиоксидантными, мембраностабилизирующими и нормализующими микроциркуляцию свойствами, способны воздействовать на развитие воспалительного процесса. Одним из таких препаратов является разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова мексидол (сукцинат этилметилгидроксипиридина), который обладает антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием, улучшает микроциркуляцию и реологические свойства крови, в том числе стабилизирует мембранные структуры эритроцитов и тромбоцитов при гемолизе [12].

Целью данной работы является изучение влияния мексидола на выраженность противовоспалительного действия нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) — селективного ингибитора ЦОГ-2 эторикоксиба и неселективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия. Для реализации этой цели было проведено исследование действия препаратов на каррагенановый отек лапы у крыс и мышей, являющийся моделью острого экссудативного воспаления, сопровождающегося значительным повышением в поврежденных тканях экспрессии ЦОГ-2, индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) [13] и концентрации продуктов свободнорадикального окисления липидов [14–16].

Материалы и методы

В работе использованы половозрелые аутбредные белые мыши-самцы массой 24–29 г и половозрелые аутбредные белые крысы-самцы массой 245–280 г, полученные из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область, Россия). Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животных содержали в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51, и правилами, утвержденными этической комиссией НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

Каррагенановый отек лапы у крыс вызывали субплантарным введением 0,1 мл 1%-ного раствора каррагенана (Sigma-Aldrich, США) в заднюю лапу животных [17]. Отек лапы регистрировали по разнице диаметра лапы в области плюсны, измеренного штангенциркулем (миллиметры), через 1, 2, 3 и 4 ч после индукции воспаления относительно диаметра до введения раствора каррагенана.

Каррагенановый отек лапы у мышей вызывали субплантарным введением 0,05 мл 2,5%-ного раствора каррагенана в заднюю лапу животных [13]. Отек лапы регистрировали по разнице диаметра лапы в области плюсны, измеренного штангенциркулем (миллиметры), через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч после индукции воспаления относительно диаметра до введения раствора каррагенана.

Диклофенак натрия (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария) применяли в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг; эторикоксиб (Merck sharp & Dohme B.V., Нидерланды) — в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг; мексидол (ООО «НПК «ФАРМАСОФТ», Россия) — в дозе 25 мг/кг; использовали комбинации диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг, эторикоксиба в дозе 1 мг/кг и мексидола в дозе 25 мг/кг; физиологический раствор (контрольной группе) животным вводили перорально за 1 ч до индукции воспаления.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью языка программирования R версии 4.0.3. Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро-Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Левена. При статистической обработке экспериментальных данных использовали параметрические и непараметрические методы анализа: дисперсионный анализ (ANOVA), критерий Стьюдента, критерий Даннета, критерий Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни. По полученным в обоих опытах данным для каждой экспериментальной группы строили график зависимости изменения отека лап животных от времени, регистрируемого соответственно в течение 4 ч при моделировании каррагенанового отека у крыс и в течение 6 ч — при моделировании каррагенанового отека у мышей. Для каждого графика методом трапеций вычисляли площадь под кривой (мм²). Результаты на графиках представлены в виде среднего значения; в таблице — как среднее значение $\pm$ ошибка среднего (стандартное отклонение). Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Каррагенановый отек у крыс нарастал в течение 3 ч после введения флогогена, достигая максимума, равного увеличению диаметра плюсны животных на 2,1 мм относительно фоновых значений, и снижался к 4 ч после индукции воспали-

ния (рис. 1). Неселективный ингибитор ЦОГ диклофенак натрия при пероральном введении оказывал дозозависимое противовоспалительное действие. Этот препарат в дозе 1 мг/кг статистически значимо снижал степень отечности лап крыс через 1, 3 и 4 ч после введения раствора каррагенена — на 28,0%, 37,1% и 21,4 % соответственно; в дозе 10 мг/кг его эффект характеризовался значимым уменьшением экссудации на 52,0%, 33,0%, 50,5% и 35,9% через 1, 2, 3 и 4 ч соответственно после введения раствора каррагенана по сравнению с контрольной группой. Площади под кривой для групп диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг были ниже показателя контрольной группы на 27,9% и 42,5% соответственно. Мексидол при пероральном введении в дозе 25 мг/кг не вызывал снижения выраженности экссудативного воспаления у крыс. Введение мексидола в дозе 25 мг/кг в комбинации с диклофенаком натрия в дозе 1 мг/кг повышало антиэкссудативную эффективность диклофенака натрия. Значимое снижение отека лапы крыс относительно показателей контрольной группы наблюдалось на протяжении всего эксперимента: через 1 ч после введения каррагенана оно составляло 42,4%, через 2 ч — 34,5%, через 3 ч — 60,0%, через 4 ч — 82,4%. Это приводило к уменьшению площади под кривой изменения каррагенанового отека у крыс, которым вводили комбинацию диклофенака натрия и мексидола, на 49,3% по сравнению с контрольной группой (рис. 1, таблица). При этом комбинация мексидола в дозе 25 мг/кг и диклофенака натрия в дозе 1 мг/кг заметнее снижала показатель отечности лап крыс через 4 ч после индукции воспаления по сравнению с использованием только диклофенака: увеличение диаметра плюсны животных, которым вводили комбинацию, было статистически значимо в 4,5 раза меньше, чем при введении препарата в дозе 1 мг/кг. Площади под кривой в группах диклофенака натрия в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг и его комбинации с мексидолом значимо не различались.

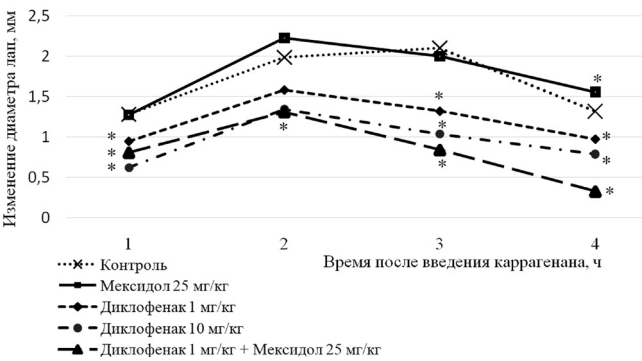


Рис. 1. Влияние диклофенака натрия и комбинации диклофенака натрия с мексидолом на выраженность каррагенанового отека у крыс. Примечание: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, в каждой группе 9–10 крыс.

Эторикоксиб в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, как и диклофенак натрия в этих дозах, снижал выраженность экссудативного воспаления у крыс с каррагенановым отеком лапы, статистически значимой разницы в эффективности этих НПВП не зафиксировано. В отличие от диклофенака натрия, при применении эторикоксиба не наблюдалось выраженной дозозависимости антиэкссудативного эффекта. Эторикоксиб в дозе 10 мг/кг чуть сильнее снижал отек лап животных через 1 и 4 ч после введения раствора каррагенана, чем в дозе 1 мг/кг. При его применении по сравнению с контрольной группой снижение отека составляло 51,2%, 29,5%, 33,8% и 36,6% через 1, 2, 3 и 4 ч соответственно после индукции воспаления, уменьшение площади под кривой — 33,1%. Эторикоксиб в дозе 1 мг/кг по сравнению с контрольной группой статистически значимо снижал отек через 1, 2 и 3 ч после введения раствора каррагенана на 24,8%, 38,0% и 40,0% соответственно, площадь под кривой — на 36,1% (рис. 2, таблица). Комбинация эторикоксиба в дозе 1 мг/кг с мексидолом в дозе 25 мг/кг сильнее подавляла отечность через 1 и 4 ч после введения каррагенана: разница по сравнению с контрольной группой через 1 ч составляла 58,4%, через 4 ч — 58,8% (рис. 2).

Таблица

Значения площади под кривой для графиков изменения отечности лап крыс и мышей с каррагенановым отеком при действии НПВП и их комбинаций с мексидолом; среднее значение $\pm$ ошибка среднего (стандартное отклонение)

Группы	Площадь под кривой, мм ²	
	крысы	мыши
Каррагенан + физиологический раствор	5,37 $\pm$ 0,36 (1,12)	7,14 $\pm$ 0,62 (1,74)
Мексидол 25 мг/кг	5,65 $\pm$ 0,31 (0,99)	6,02 $\pm$ 0,49 (1,38)
Диклофенак 1 мг/кг	3,87 $\pm$ 0,44 (1,41)*	6,12 $\pm$ 0,43 (1,36)#
Диклофенак 10 мг/кг	3,09 $\pm$ 0,42 (1,27)*	4,66 $\pm$ 0,53 (1,59)*
Диклофенак 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	2,72 $\pm$ 0,34 (1,03)*	3,91 $\pm$ 0,30 (0,95)*
Эторикоксиб 1 мг/кг	3,43 $\pm$ 0,29 (0,88)*	5,17 $\pm$ 0,45 (1,35)*#
Эторикоксиб 10 мг/кг	3,59 $\pm$ 0,31 (0,92)*	5,17 $\pm$ 0,45 (1,34)*#
Эторикоксиб 1 мг/кг + Мексидол 25 мг/кг	3,25 $\pm$ 0,44 (1,31)*	3,94 $\pm$ 0,38 (1,19)*

Примечания: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Даннета;
— $p \leq 0,05$ по сравнению с соответствующей комбинацией НПВП и мексидола, критерий Даннета

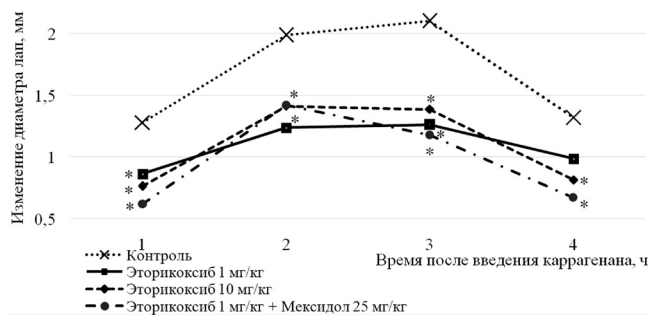


Рис. 2. Влияние эторикоксиба и комбинации эторикоксиба с мексидолом на выраженность каррагенанового отека у крыс. Примечание: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, в каждой группе 9–10 крыс.

Максимальная отечность лап у мышей с каррагенановым отеком зарегистрирована через 2 ч после индукции воспаления и соответствовала увеличению диаметра плюсны животных на 1,75 мм; с 3 по 6 ч наблюдения она постепенно снижалась до показателя, равного 0,99 мм (рис. 3). Мексидол в дозе 25 мг/кг на отечность лап мышей влияния не оказывал. Дозозависимость антиэкссудативного эффекта диклофенака на этой модели наблюдалась ярче, чем при введении препарата крысам. Так, при применении неселективного ингибитора ЦОГ в дозе 1 мг/кг статистически значимое снижение отека лап животных зафиксировано только через 1 ч (на 30,0%) после введения флогогена, показатель площади под кривой значимо не снижался по сравнению с контрольной группой (рис. 3, таблица). Диклофенак в дозе 10 мг/кг статистически значимо подавлял отечность лап мышей через 1, 3, 4, 5 и 6 ч после индукции воспаления относительно показателей контрольной группы на 37,1%, 34,7%, 28,1%, 36,1% и 49,5% соответственно, площадь под кривой уменьшалась на 34,7% (рис. 3, таблица). Диклофенак в дозе 1 мг/кг в комбинации с мексидолом в дозе 25 мг/кг оказывал наиболее выраженное антиэкссудативное действие: значимое снижение диаметра плюсны животных на 42,9%–60,6% по сравнению с контрольной группой зарегистрировано на протяжении всего опыта, площадь под кривой была ниже на 45,2% (рис. 3, таблица). При этом эффект комбинации диклофенака и мексидола не отличался от эффекта диклофенака в дозе 10 мг/кг и статистически значимо превышал эффект препарата в дозе 1 мг/кг со 2 по 6 ч опыта на 21,3%–54,7% (площадь под кривой при этом снизилась на 36,1%).

Эторикоксиб на модели каррагенанового отека у мышей, как и на модели каррагенанового отека у крыс, в дозах 1 и 10 мг/кг вызывал сопоставимый антиэкссудативный эффект, о чем свидетельствуют равные значения площадей под кривой для этих групп. При этом противовоспалительный эффект препарата в этих дозах был не таким значительным, как при применении диклофенака в дозе 10 мг/кг. По сравнению с контрольной груп-

пой при применении эторикоксиба в дозе 10 мг/кг статистически значимое снижение отека наблюдалось только через 2 и 6 ч после введения флогогена на 20,6% и 44,4% соответственно, в дозе 1 мг/кг — через 1 и 6 ч на 54,3% и 37,4% соответственно, площадь под кривой была ниже на 27,6% (рис. 4, таблица). Мексидол (25 мг/кг) усилил антиэкссудативное действие эторикоксиба (1 мг/кг) на модели каррагенанового отека у мышей: площадь под кривой при применении этой комбинации препаратов была ниже показателя групп, которым вводили только селективный ингибитор ЦОГ-2 в обеих изучаемых дозах, на 23,8% (таблица). При этом отек лап мышей, которым вводили комбинацию препаратов, также был статистически значимо менее выраженным по сравнению с отеком в группе эторикоксиба в дозе 1 мг/кг через 2 (на 40,6%) и 3 (на 27,9%) ч после индукции воспаления и по сравнению с отеком в группе эторикоксиба в дозе 10 мг/кг — через 1 (на 42,4%) и 2 (на 38,8%) ч после введения раствора каррагенана.

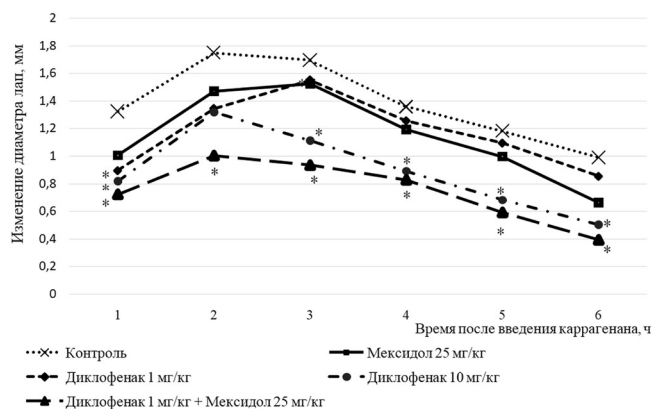


Рис. 3. Влияние диклофенака натрия и комбинации диклофенака натрия с мексидолом на выраженность каррагенанового отека у мышей. Примечание: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, в каждой группе 8–10 мышей.

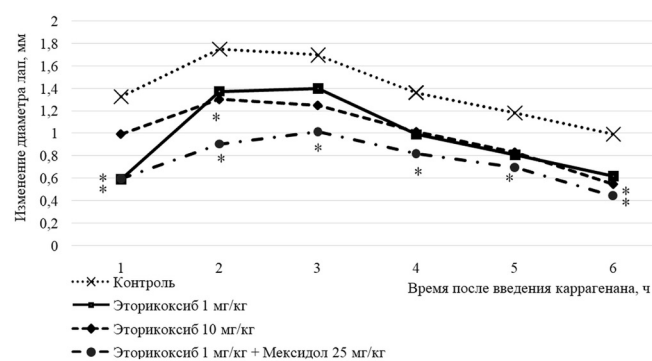


Рис. 4. Влияние эторикоксиба и комбинации эторикоксиба с мексидолом на выраженность каррагенанового отека у мышей. Примечание: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, в каждой группе 8–10 мышей.

Полученные результаты свидетельствуют о способности мексидола в малой дозе (25 мг/кг) усиливать противовоспалительное (антиэкссудативное) действие неселективного ингибитора ЦОГ диклофенака натрия (1 мг/кг) и селективного ин-

гибитора ЦОГ-2 эторикоксиба (1 мг/кг) при пероральном введении препаратов на модели каррагенанового отека у крыс и мышей. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о том, что комбинация мексидола (100 мг/кг, внутривенно) с диклофенаком натрия (5 мг/кг, внутривенно) оказывает противовоспалительный эффект такого же уровня, что и при введении только этого НПВП в дозе 10 мг/кг [18]. Кроме того, известно, что совместное использование янтарной или липоевой кислоты, а также витаминов С и Е с рядом НПВП (ацетилсалициловой кислотой, индометацином, напроксеном, диклофенаком, нифлумовой кислотой, бутадиионом, пироксикамом) при пятидневной схеме применения (перорально) приводит к повышению их антиэкссудативной эффективности на модели каррагенанового отека у мышей [19], а при однократном внутривенном применении ацетилсалициловой кислоты (100 мг/кг) в комбинации с антигипоксантом/антиоксидантом гипоксеном (50 мг/кг) наблюдается снижение лейкоцитоза и СОЭ в крови крыс с каррагенановым отеком лапы [20].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang M.-K., Binder C.J., Miller Y.I., Subbanagounder G., Silverman G.J., Berliner J.A., Witztum J.L. Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory // *J. Exp. Med.* 2004. Vol. 200. N 11. P. 1359–1370.
2. Chou M.-Y., Hartvigsen K., Hansen L.F., Fogelstrand L., Shaw P.X., Boullier A., Binder C.J., Witztum J.L. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity // *J. Intern. Med.* 2008. Vol. 263. N 5. P. 479–488.
3. Leslie C.C. Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease // *J. Lipid. Res.* 2015. Vol. 56. N 8. P. 1386–1402.
4. Calder P.C. Eicosanoids // *Essays Biochem.* 2020. Vol. 64. N 3. P. 423–441.
5. Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Vol. 90. N 24. P. 11693–11697.
6. Ricciotti E., Fitzgerald G.A. Prostaglandins and inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011. Vol. 31. N 5. P. 986–1000.
7. McAdam B.F., Mardini I.A., Habib A., Burke A., Lawson J.A., Kapoor S., Fitzgerald G.A. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation // *J. Clin. Invest.* 2000. Vol. 105. N 10. P. 1473–1482.
8. Smyth E.M., Grosser T., Wang M., Yu Y., Fitzgerald G.A. Prostanoids in health and disease // *J. Lipid Res.* 2009. Vol. 50 (Suppl). P. S423–S428.
9. Crofford L.J., Wilder R.L., Ristimaki A.P., Sano H., Remmers E.F., Epps H.R., Hla T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 93. N 3. P. 1095–1101.
10. Schonbeck U., Sukhova G.K., Graber P., Coulter S., Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions // *Am. J. Pathol.* 1999. Vol. 155. N 4. P. 1281–1291.
11. Mardini I.A., Fitzgerald G.A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs // *Mol. Interv.* 2001. Vol. 1. N 1. P. 30–38.
12. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейрорепрогенные эффекты и механизм действия // *Фарматека*. 2009. Т. 180. № 6. С. 1–4.
13. Rafiee L., Hajhashemi V., Javanmard S.H. Maprotiline inhibits COX2 and iNOS gene expression in lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages and carrageenan-induced paw edema in rats // *Cent. Eur. J. Immunol.* 2019. Vol. 44. N 1. P. 15–22.
14. Kuedo Z., Sangsuriyawong A., Klaypradit W., Tipmanee V., Chonpathompikunlert P. Effects of Astaxanthin from *Litopenaeus Vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice // *Molecules*. 2016. Vol. 21. N 3: 382.
15. Abd-Allah A.A.M., El-Deen N.A.M.N., Mohamed W.A.M., Naguib F.M. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema // *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2018. Vol. 21. N 1. P. 97–107.
16. Mitrea D.R., Malkey R., Florian T.L., Filip A., Clichici S., Bidian C., Moldovan R., Hoteiuc O.A., Toader A.M., Baldea I. Daily oral administration of chlorogenic acid prevents the experimental carrageenan-induced oxidative stress // *J. Physiol. Pharmacol.* 2020. Vol. 71. N 1. P. 55–65.
17. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962. Vol. 111. P. 544–547.

18. Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Усиление противовоспалительного и анальгетического эффекта диклофенака натрия при его применении в комбинации с мексидолом в эксперименте на грызунах // Эксперим. клин. фармакол. 2020. Т. 83. № 8. С. 38–42.

19. Хазанов В.А. Фармацевтические композиции на основе нестероидных противовоспалительных средств. Патент на изобретение RU 2191582, Бюлл. № 30. 2002.

20. Новиков В.Е., Илюхин С.А. Влияние гипоксена на эффективность кислоты ацетилсалициловой при

остром воспалении // Эксперим. клин. фармакол. 2013. Т. 76. № 4. С. 32–35.

21. Smirnov L.D., Voronina T.A., Dyumaev K.M. Effect of a 3-hydroxypyridine derivative membrane modulator on pharmacological activity of some psychotropic drugs // Bull. Exp. Biol. Med. 1985. Vol. 99. N 5. P. 537–540.

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.

После доработки 25.03.2021 г.

Принята в печать 28.04.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Ability of mexidol to enhance antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib in rats and mice with carrageenan-induced edema

Е.А. Ivanova* , А.И. Matyushkin , А.Г. Vasilchuk , Т.А. Voronina 

Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia

*e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are some of the most widely used drugs in existence. However, they can cause numerous side effects. Therefore, it is crucial to develop approaches to reducing the severity of their side effects. **The purpose of this study** is to investigate the effect of mexidol on the anti-inflammatory activity of NSAIDs, such as selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor etoricoxib and non-selective COX inhibitor diclofenac sodium. **Materials and methods.** Effect of a single oral dose of the drugs was evaluated in rats and mice with carrageenan-induced edema by measuring the severity of edema over a period of 4 and 6 hrs, respectively. **Results.** Diclofenac sodium at doses of 1 and 10 mg/kg exhibits a dose-dependent antiexudative effect, the effect of etoricoxib at these doses is comparable, mexidol at a dose of 25 mg/kg does not exhibit an antiexudative effect. In mice, the effect of a combination of diclofenac sodium at a dose of 1 mg/kg and mexidol at a dose of 25 mg/kg is non-inferior to diclofenac sodium at a dose of 10 mg/kg and superior the effect of diclofenac sodium at a dose of 1 mg/kg. In rats, the combination of diclofenac sodium and mexidol significantly reduces the severity of edema at 4 hrs after its induction compared with diclofenac sodium at a dose of 1 mg/kg only. In mice, a combination of etoricoxib at a dose of 1 mg/kg and mexidol at a dose of 25 mg/kg is more effective than etoricoxib at doses of 1 and 10 mg/kg. In rats, etoricoxib at a dose of 10 mg/kg and the combination of etoricoxib at a dose of 1 mg/kg and mexidol at a dose of 25 mg/kg have a comparable effect. **Conclusion.** Mexidol at a low dose (25 mg/kg) enhances the antiexudative effect of diclofenac sodium and etoricoxib. And, therefore, a decrease in the dose of NSAIDs in combination with mexidol will help to reduce the side effects of these drugs.

Keywords: mexidol, diclofenac sodium, etoricoxib, exudative inflammation, carrageenan-induced edema, rats, mice

Funding: This study was performed under the state assignment of Zakusov Institute of Pharmacology, project number 0521-2019-0007.

Сведения об авторах

Иванова Елена Анатольевна — канд. фарм. наук, ст. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14 e-mail: iwanowaea@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-2051>

Матюшкин Александр Иванович — мл. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: matyushkin.alex@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7640-0551>

Васильчук Анастасия Геннадьевна — мл. науч. сотр. лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: jimlev@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9079-1322>

Воронина Татьяна Александровна — проф., докт. мед. наук, зав. лабораторией психофармакологии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: voroninata38@gmail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0200-5097>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.323

**Дизайн биосенсоров нуклеиновых кислот
на основе систем CRISPR/Cas и репортерных сплит-белков****Р.В. Новиков^{1,2,#}, А.К. Грибкова^{1,2,#}, Ю.Г. Качер^{1,2,#}, П.А. Зайцев^{1,2}, Г.А. Армеев^{1,2},
Г.С. Глухов^{1,2}, А.К. Шайтан^{1,2,3,*} **¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Научно-технологический университет «Сириус», Россия, 354340, г. Сочи, ул. Олимпийская, д. 1;*³*Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Россия, 109028, г. Москва, Покровский бульвар, д. 11***e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru*

— равноценный вклад

Для диагностики многих болезней человека, животных и растений, мониторинга окружающей среды необходимы высокочувствительные, специфичные, быстрые и простые в использовании диагностические методы детекции нуклеиновых кислот патогенов. Альтернативой методу полимеразной цепной реакции, который требует дорогостоящего лабораторного оборудования, являются подходы, основанные на использовании естественной способности бактериальных CRISPR/Cas9-систем к узнаванию последовательностей ДНК с высокой специфичностью в изотермических условиях. Разработка методов регистрации сигнала при образовании комплекса ДНК/РНК/Cas9-белок является отдельной биоинженерной задачей. В данной работе нами разработан дизайн и исследована применимость биосенсорной системы, основанной на связывании двух dCas9-белков с целевыми последовательностями ДНК (без их разрезания) и детекции их сококализации с помощью репортерных систем на основе сплит-ферментов. Методами молекулярного моделирования определены возможные взаимные расположения двух dCas9-белков на детектируемом локусе геномной ДНК, позволяющие оптимальным образом взаимодействовать присоединенным к ним доменам сплит-ферментов. Определены оптимальные расстояния на ДНК между сайтами связывания dCas9-белков в различной ориентации, смоделирована зависимость структуры комплекса от расстояния между сайтами связывания dCas9-белков. Методами биоинформатики проанализированы геномы ряда вирусов (включая SARS-CoV-2), показано наличие уникальных для вида геномных локусов, допускающих возможность посадки пар dCas9-белков в оптимальных положениях. Проанализирована возможность комбинированного использования dCas9-белков из различных бактерий для расширения спектра детектируемых локусов. Результаты работы свидетельствуют о принципиальной возможности создания высоко-специфичных биосенсоров нуклеиновых кислот на основе комбинации технологий CRISPR/Cas9 и сплит-ферментов.

Ключевые слова: биосенсоры, CRISPR/Cas, нуклеиновые кислоты, сплит-белки, бета-лактамаза, молекулярное моделирование, геномный анализ

Методы детекции нуклеиновых кислот с заданной последовательностью нуклеотидов играют важнейшую роль в диагностике заболеваний человека и животных, мониторинге состояния окружающей среды, генотипировании, установлении родства и т.д. Идеальная тест-система, детектирующая нуклеиновые кислоты, должна обладать высокой чувствительностью, специфичностью, низкой стоимостью проведения анализа, позволять производить детекцию в кратчайшие сроки без необходимости использования дорогостоящего оборудования. На сегодняшний день наибольшее распространение получили диагностические тест-

системы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Теоретически ПЦР позволяет регистрировать отдельные молекулы в реакционной смеси, однако предел чувствительности основанных на ПЦР тест-систем, применяемых на практике, сильно зависит от используемого протокола и может достигать сотен тысяч молекул ДНК на миллилитр [1]. Метод ПЦР требует дорогостоящего оборудования, позволяющего циклическим образом изменять температуру небольшого объема реакционной смеси в четко заданных интервалах, а также регистрировать сигналы флуоресценции. Таким образом,

проведение ПЦР-анализов возможно только в специализированных лабораториях, что приводит к значительному промежутку времени между забором биоматериала и получением результата (обычно не менее суток). Данные ограничения являются стимулом для разработки и создания более совершенных диагностических тест-систем, которые можно, в том числе, применять для быстрой диагностики непосредственно в пунктах оказания медицинской помощи, иных ситуациях с ограниченным доступом к лабораторной инфраструктуре или требующих быстрого получения результатов анализа. Потребность в таких системах стала особенно актуальной в связи с пандемией коронавируса SARS-CoV-2 [1]. Ключевыми направлениями в решении данной задачи являются (1) переход к «изотермическим» подходам, когда реакционную смесь, в которой осуществляется ключевой этап детекции нуклеиновых кислот, достаточно просто поддерживать при постоянной температуре, (2) использование простых визуальных методов детекции сигнала (например, по изменению цвета раствора или появлению окрашенных полосок по аналогии с иммунохроматографическими тест-системами). В качестве перспективного изотермического подхода, уже применяемого на практике, можно привести метод LAMP (loop-mediated isothermal amplification), основанный на использовании Bst-полимеразы, которая способна проводить амплификацию при постоянной температуре. Этот подход обычно позволяет получить результат в пределах 60 мин, не требует использования дорогостоящего оборудования, также он более устойчив к ингибиторам реакции, чем ПЦР, однако требует термостата с достаточно высокой температурой (~65°C) и предполагает достаточно сложную процедуру дизайна праймеров, что затрудняет их подбор для конкретной задачи [2].

Наряду с методами детекции, основанными только на амплификации нуклеиновых кислот, не так давно начали разрабатываться подходы принципиально иного рода, основанные на использовании CRISPR-Cas-систем и их способности программируемым образом специфически связываться с последовательностями ДНК/РНК. Такие подходы получили название CRISPR-Dx (от англ. CRISPR-based diagnostics). Системы CRISPR-Cas являются адаптивной иммунной системой бактерий, уничтожающей чужеродные генетические элементы, попадающие в клетку [3]. При первичном инфицировании ряд белков системы осуществляет захват генетической информации патогена и записывает ее в CRISPR-локус генома бактерии в виде, так называемых, последовательностей спейсеров. Наиболее изученными являются CRISPR-Cas-системы класса 2 типа II, в которых ключевую роль играет эффекторная нуклеаза Cas9 (в частности, SpCas9 бактерии *Streptococcus pyogenes*). Cas9 формирует комплекс с двумя

РНК – крРНК, несущей информацию о последовательности спейсера, и небольшой вспомогательной тракрРНК. Данный комплекс специфичным образом связывается с последовательностями ДНК за счет образования гетеродуплекса между областью ДНК патогена (называемой протоспейсером) и комплементарным участком спейсера крРНК. Также критическим для связывания с мишенью является наличие фиксированного мотива ДНК (РАМ-последовательности), узнаваемого самим Cas9-белком. РАМ-последовательности у Cas9-систем из разных бактерий варьируются по составу и длине (приблизительно от 3 до 8 нуклеотидов). После связывания нуклеаза разрезает целевую ДНК. Для редактирования геномов получили распространение искусственные варианты Cas9-систем, где крРНК и тракрРНК объединены в одну гидовую РНК (гРНК). Вариации CRISPR-Cas-систем класса 2, например, основанные на нуклеазах типа Cas12, Cas13 или Cas14, могут обладать способностью к связыванию одноцепочечной ДНК или РНК, а также обладать так называемой коллатеральной активностью, когда при связывании мишени фермент начинает разрезать любую РНК или ДНК в растворе. Последнее свойство лежит в основе разрабатываемых сейчас систем детекции нуклеиновых кислот, таких как SHERLOCK, DETECTR и родственных им. В системе SHERLOCK используется нуклеаза Cas13, которая узнает одноцепочечные фрагменты РНК. Активирующаяся таким образом коллатеральная активность фермента в отношении РНК измеряется с помощью расщепления сигнальных молекул, которые состоят из флуорофора и гасителя, связанных синтетической молекулой РНК [4]. Также существуют варианты адаптации системы считывания сигнала для использования иммунохроматографических полосок [5]. Система DETECTR использует ДНК-специфичные нуклеазы Cas12 или Cas14, которые связываются с двухцепочечными или одноцепочечными молекулами ДНК соответственно. Вышеописанные подходы и аналогичные им обычно предполагают шаг преамплификации одним из изотермических методов, например, LAMP или RPA [2, 6]. Чувствительность результирующих методов сравнима с лучшими вариантами ПЦР-анализа (детекция единичных молекул нуклеиновых кислот в миллилитре) [4]. К плюсам метода можно отнести небольшое время детекции (от 10 мин). Ограничениями метода на данный момент является сложность получения компонентов системы, отсутствие готовых коммерчески доступных тест-систем, необходимость использования РНК/ДНК, модифицированных флуорофорами.

Альтернативный подход к применению CRISPR-Cas-систем для детекции состоит в использовании их свойств связываться с целевыми последовательностями ДНК (binding-based biosensing) [7]. Путем введения точечных мутаций

в Cas9-белок может быть получен dCas9-белок (замены D10A и H841A для SpCas9), который по-прежнему связывается с ДНК, но не разрезает ее [8]. Связывание комплексов Cas9-гРНК с ДНК высоко чувствительно к наличию даже однонуклеотидных несоответствий между последовательностями спейсера и протоспейсера [9]. Такая чувствительность открывает перспективы создания сенсоров, способных осуществлять генотипирование организмов, вирусов, детекцию соматических мутаций.

В данной работе нами исследовался вопрос об оптимальной конструкции тест-систем, основанных на связывании dCas9-гРНК-комплексов с целевым локусом ДНК. В качестве принципа детекции сигнала рассмотрена схема, основанная на связывании фрагментов сплит-ферментов, пришитых к dCas9-белкам. Методами моделирования выявлены оптимальные расположения пар dCas9-белков, длины пептидных линкеров для присоединения сплит-фрагментов. Методами геномного анализа продемонстрировано, что предлагаемая конструкция биосенсора позволяет ему специфически связываться с геномными локусами ряда вирусов, в том числе различать гаплотипы вирусов, отличающихся единичными мутациями.

Материалы и методы

Молекулярное моделирование. Атомистические молекулярные модели связывания двух dCas9-белков с ДНК создавались с помощью скриптов на языке Python для программы UCSF Chimera [10]. Для моделирования dCas9/гРНК/ДНК-комплекса была выбрана структура SpCas9/гРНК/ДНК с PDB ID 5Y36 [11]. Для моделирования дополнительной ДНК между двумя dCas9-комплексами была использована структура идеальной ДНК в В-форме. Для ее соединения с моделями dCas9-комплексов выполнялось структурное выравнивание двух крайних нуклеотидов соединительной ДНК с двумя крайними нуклеотидами ДНК дуплекса в структуре dCas9-комплекса. Выравнивание проводилось методом минимизации среднеквадратичного отклонения положений следующих атомов нуклеотидов: O5', C5', C4', O4', C3', O3', C2', C1'. Для измерения расстояний и углов в получаемых структурах использовались пакеты MDAnalysis и NumPy [12, 13]. В качестве меры оптимальности расположения концов полипептидной цепи dCas9-белков относительно оси ДНК вычислялся двугранный угол α , образованный следующими точками: геометрические центры N- и C-концевых аминокислотных остатков двух dCas9-белков и геометрические центры двух центральных C1'-атомов ДНК, разделяющей dCas9-белки. Построение графиков проводилось с помощью библиотеки Matplotlib [14].

Геномный анализ. Для поиска детектируемых локусов (мишеней) в выбранных геномах или генах

для различных комбинаций dCas9-белков из разных организмов и различных комбинаций взаимной ориентации dCas9-белков был реализован программный код на языке Python. Использовались dCas9-белки *Streptococcus pyogenes* (SpdCas9), *Staphylococcus aureus* (SadCas9), *Campylobacter jejuni* (CjdCas9), *Streptococcus thermophilus* (StdCas9), различающиеся длиной и последовательностью связываемых PAM-сайтов: NGG, NNGRRT, NNNNAYAC, NNAGAAW соответственно (где N – любой нуклеотид, R – А или G, Y – С или Т, W – А или Т), а также оптимальной длиной протоспейсера, узнаваемого dCas9-белком: 20, 21, 22 или 20 нуклеотидов соответственно. Нуклеотидные последовательности загружались из базы NCBI RefSeq [15]. Поиск мишеней осуществлялся в аннотированных белок-кодирующих регионах (исключая регионы аннотированные как гипотетические белки) с помощью регулярных выражений. Для анализа РНК-вирусов использовалась комплементарная двуцепочечная ДНК. Для поиска мишеней на возможные расстояния между сайтами посадки dCas9-белков вдоль ДНК накладывались ограничения, соответствующие оптимальным вариантам взаимного расположения dCas9-белков, определенным в ходе молекулярного моделирования. Для каждой найденной пары PAM-сайтов определялись соответствующие последовательности протоспейсеров. С целью анализа количества потенциальных мишеней и их специфичности для обсуждаемых тест-систем были выбраны полные геномы следующих видов вирусов: SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2, размер 29903 п.о.), SARS-CoV (NC_004718.3, размер 29751 п.о.), MERS-CoV (NC_019843.3, размер 30119 п.о.). Поиск возможных мишеней в генах был проведен в генах N (1259 п.о.) и E (227 п.о.) вируса SARS-CoV-2. Демонстрация применимости биосенсора для детекции однонуклеотидных полиморфизмов проводилась на примере 13 несинонимичных точечных мутаций, отличающих гаплотипы вируса SARS-CoV-2 (UK variant VOC-202012/01 и isolate Wuhan-Hu-1) в генах ORF1ab (C3267T, C5388A, T6954C), Spike (A23063T, C23271A, C23604A, C23709T, T24506G, G24914C), ORF8 (C27972T, G28048T, A28111G), N (C28977T). Для глобального выравнивания геномов использовали MAFFT [16] с базовыми настройками.

Результаты и обсуждение

Общий принцип работы биосенсора. При разработке биосенсоров, основанных на специфическом связывании белков с нуклеиновыми кислотами, ключевым вопросом является сопряжение данного связывания с генерацией некоторого детектируемого сигнала от тест-системы. Такую генерацию сигнала можно реализовать путем одновременного связывания двух CRISPR-dCas9-комплексов с соседними, пространственно близ-

кими, участками локуса ДНК. В этом случае dCas9-белки можно использовать как носители для пространственного сближения различных пар репортерных белковых фрагментов или доменов, заранее пришитых к dCas9-белкам. Особый интерес представляют так называемые сплит-ферменты [17]. Сплит-ферменты — это ферменты, искусственно разделенные на два белковых фрагмента, которые могут спонтанно соединяться в целый функциональный фермент. Для работы в качестве сплит-ферментов были, например, адаптированы люцифераза светлячка и бактериальная β -лактамаза [18, 19]. β -Лактамаза в качестве сплит-фермента обладает рядом преимуществ: маленький размер (21 кДа), независимость от незначительных колебаний pH, возможность колориметрической детекции сигнала в результате расщепления хромогенного субстрата (например, нитроцефина), усиление сигнала за счет накопления продуктов реакции со временем. С учетом вышесказанного, принципиальная схема биосенсора на основе dCas9-белков, связанных с фрагментами β -лактамазы, приведена на рисунке (1А). При дизайне конкретной конструкции биосенсора возникает ряд принципиальных вопросов. Во-первых, необходимо решить вопрос об оптимальной взаимной ориентации dCas9-комплексов относительно друг друга. Данное расположение определяется (1) вариантами выбора цепей ДНК, с которыми будут связываться комплексы (PAM-in, PAM-out или PAM-direct, см. рисунок, 1А), (2) расстоянием вдоль ДНК между сайтами связывания комплексов, (3) взаимной ориентацией точек крепления сплит-ферментов относительно оси ДНК. Во-вторых, необходимо решить вопрос об оптимальном прикреплении доменов сплит-системы (к С или N-концу каждого dCas9-белка). В-третьих, необходимо решить вопрос об оптимальной длине пептидного линкера, соединяющего сплит-домены с dCas9-белками. Наконец, поскольку связывание dCas9-белков с конкретными локусами ограничено наличием соответствующих PAM-сайтов в местах связывания, немаловажным является вопрос изучения наличия пригодных для посадки пар сайтов в геномах детектируемых организмов. Различие в последовательности и длине PAM-сайтов у dCas9-белков из разных видов бактерий открывает возможности для сочетания различных dCas9-белков с целью оптимизации количества потенциальных сайтов посадки с одной стороны и специфичности биосенсора с другой стороны. Дизайн системы с учетом вышеописанных соображений и ограничений является многопараметрической задачей, исследованию которой посвящены следующие разделы.

Молекулярное моделирование биосенсора на основе двух dCas9-белков. При дизайне биосенсора, основанного на фьюжн-системе dCas9-белков с частями сплит-фермента, важным шагом явля-

ется определение взаимной ориентации dCas9-белков в составе нуклеопротеинового комплекса и расстояния между ними, так как эти параметры напрямую влияют на эффективность работы биосенсора. Такой анализ был проведен нами путем молекулярного моделирования систем двух dCas9-комплексов в трех взаимных ориентациях (рисунок, 1А). Важно отметить, что при изменении расстояния между dCas9-комплексами происходит изменение расстояния между концевыми аминокислотными остатками dCas9-белков (к которым крепятся сплит-домены), а также изменение их ориентационного расположения относительно ДНК, характеризуемого углом α (см. «Материалы и методы»). Эти параметры, наряду с взаимной ориентацией белков, влияют на эффективность работы биосенсора: при выборе комплекса с большим значением расстояния между точками крепления сплит-фрагментов существует вероятность того, что части сплит-фермента не объединятся, а если выбранный комплекс обладает большим значением угла между остатками, такому объединению может препятствовать разделяющая комплексы ДНК. На основе моделирования была получена зависимость расстояния между N- и C-концевыми остатками dCas9-белков (к которым можно присоединить части сплит-фермента), а также угла α от расстояния между PAM-сайтами (рисунок, 1Б). На основании этих данных были определены оптимальные варианты крепления частей сплит-фермента, а именно, для ориентации PAM-in — C-концы dCas9-белков; для ориентации PAM-out — N-концы dCas9-белков; для ориентации PAM-direct — C-конец dCas9-белка, располагающегося на 5'-конце узнаваемого локуса и N-конец dCas9-белка, располагающегося на 3'-конце узнаваемого локуса (ориентация локуса определяется по цепи ДНК, формирующей гетеродуплекс). Также для каждой из вышеперечисленных систем были определены оптимальные модели с наименьшими значениями расстояний между точками крепления сплит-доменов и углов α без стерических перекрытий. Наиболее оптимальными вариантами являются следующие: для ориентации PAM-direct модель с расстоянием в 41 нуклеотид между PAM-сайтами, для PAM-in — в 29 нуклеотидов и для PAM-out — в 52 нуклеотида (рисунок, 1В). Для геномного анализа также был отобран расширенный набор из 7 оптимальных расстояний между PAM-сайтами, соответствующих минимальным расстояниям между точками крепления сплит-доменов (для ориентации PAM-direct порог отсечки составил 70 Å) при значениях угла α менее 72 градусов. При последующем геномном анализе полученные результаты обобщались для dCas9-белков из различных организмов в предположении, что изменения в системе в зависимости от варианта dCas9-белка будут незначительными.

Для создания фьюжн-систем необходимым условием является использование линкера, соединяющего dCas9-белки с частями сплит-фермента. Широко используемым для создания таких систем является глицин-сериновый линкер (GGGGS)_n [20]. При выборе длины линкера существует двустороннее ограничение: слишком короткий линкер может мешать объединению сплит-доменов; в то же время, слишком длинный линкер будет приводить к тому, что вероятность взаимодействия доменов будет уменьшаться. На основании полученных в моделировании минимальных расстояний между точками крепления линкеров ($R_{\min}$: PAM-direct – 37 Å, PAM-in – 26 Å, PAM-out – 26 Å) нами были произведены оценки оптимальной длины линкеров. Расстояние между концевыми аминокислотными остат-

ками бета-лактамазы является незначительным (8 Å), поэтому при расчетах не учитывалось. Согласно простейшим моделям физики полимеров распределение вероятности для расстояния между N- и C-концевыми аминокислотными остатками линкера имеет гауссов вид

$$P_N(R) = (2\pi \langle R^2 \rangle / 3)^{-3/2} \exp\left(-\frac{3R^2}{2 \langle R^2 \rangle}\right),$$

где ширина этого распределения $\langle R^2 \rangle = l l_k$ (l – контурная длина аминокислотного остатка, l_k – длина сегмента Куна). Контурная длина одной аминокислоты составляет 3,4 Å, сегмент Куна для пептидов – 8,4 Å [21]. На основании этих оценок длина линкера в 10 аминокислот является разумной, так как обеспечивает вероятность его

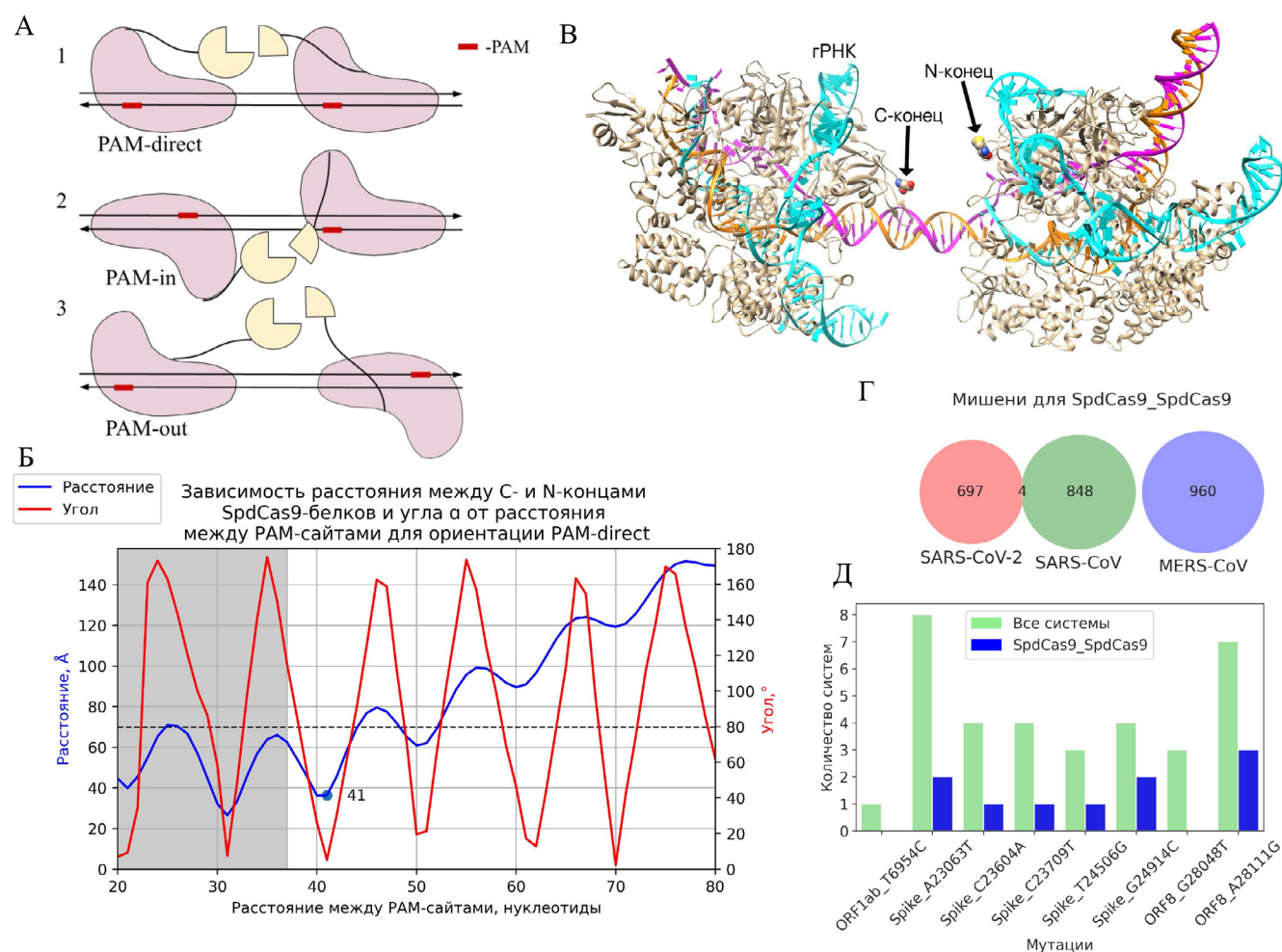


Рисунок. А. Схема возможных вариантов взаимного расположения двух dCas9-белков с пришитыми к ним фрагментами бета-лактамазы на локусе ДНК в составе рассматриваемого биосенсора; PAM-мотивы выделены красным цветом; 5'-3'-направление цепей ДНК обозначено стрелками. **Б.** График зависимости расстояния между C- и N-концами SpdCas9-белков в ориентации PAM-direct, а также угла α от расстояния между PAM-сайтами; серым выделена стерически недоступная область; оптимальная конфигурация отмечена точкой; пороговое расстояние в 70 Å показано пунктирной линией. **В.** Структура двух SpdCas9-белков в составе нуклеопротеинового комплекса в ориентации PAM-direct- с расстоянием между PAM-сайтами в 41 нуклеотид; сферами выделены C- и N-концы SpdCas9-белков. **Г.** Диаграмма Венна для найденных потенциальных мишеней в геномах коронавирусов для систем из двух SpdCas9-белков. **Д.** Гистограмма количества возможных систем для детекции несинонимичных однонуклеотидных замен, различающихся в гаплотипах SARS-CoV-2 (UK variant VOC-202012/01 и SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1); темный цвет – количество систем из двух белков SpdCas9, светлый цвет – количество всех возможных систем.

нахождения в состоянии с $R > R_{\min}/2$ в более чем 50% конформаций. При увеличении расстояния между точками крепления сплит-доменов до 70 Å вероятность все еще остается значительной (около 10%).

Анализ наличия потенциальных мишеней в геномах вирусов. Нами был разработан программный код для проверки наличия потенциальных мишеней в детектируемых геномах, генах и сайтах мутаций для разрабатываемого биосенсора из двух dCas9-белков (см. «Материалы и методы»). Рассматривались варианты молекулярной тест-системы, состоящей из комбинаций dCas9-белков: SpdCas9, StdCas9, CjdCas9, SadCas9, располагающихся на мишени в ориентациях PAM-out, PAM-in, PAM-direct (всего 64 возможных варианта). Поиск возможных мишеней был осуществлен в геномах коронавируса. Количество мишеней составило 697, 848 и 960 для SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV. Из них лишь 4 мишени были не уникальными и встречались как в геноме SARS-CoV-2, так и в геноме SARS-CoV (рисунок, 1Г), что говорит о возможности дизайна высокоспецифичных биосенсоров для конкретных вирусов. Выявленное разнообразие уникальных для вируса мишеней предоставляет возможности для выбора наиболее оптимальных и хорошо связывающихся гРНК при разработке конкретных тест-систем. Нами также был исследован вопрос о возможности использования в качестве мишеней лишь ряда генов, которые уже используются в существующих тест-системах. Поиск вирусных мишеней был осуществлен в генах E и N SARS-CoV-2. Максимальное количество мишеней в гене N найдено для системы, реализуемой на основе двух SpdCas9-белков, и составляет 59. Для всего генома SARS-CoV-2 у данной системы существует 704 возможных мишени. Для сравнительно небольшого гена E для такой же системы выявлено две потенциальные мишени. Однако за счет расширения спектра используемых dCas9-белков можно увеличить количество мишеней, и для систем из SpdCas9 и StdCas9 в гене E уже возможно 4 мишени. Преобладающее количество мишеней найдено для систем с SpdCas9, SadCas9 и CjdCas9, что связано с меньшими ограничениями на последовательность PAM-сайтов. Для системы StdCas9-StdCas9 в ориентации PAM-in в геноме SARS-CoV-2 не обнаружено возможных мишеней.

Появление новых вариантов вирусов (гаплотипов) с единичными мутациями подчеркивает необходимость развития молекулярного инструментария с однонуклеотидной специфичностью, способных отличить один вариант от другого. Нами был проведен поиск специфических мишеней в сайтах мутаций варианта SARS-CoV-2 UK VOC-202012/01. Результаты анализа количества возможных вариантов тест-систем (состоящих

только из SpdCas9 белков или всех возможных пар dCas9-белков) для посадки на сайты мутаций приведены на рисунке (1Д). Для 8 из 13 сайтов однонуклеотидных несинонимических замен можно подобрать мишени для детекции с помощью как минимум одной из рассматриваемых тест-систем, а для замены A23063T (N501Y) в спайк-белке, которая приводит к лучшему связыванию белка с клеточными рецепторами [22], было найдено 4 возможных варианта детектирующей системы.

Таким образом, в результате моделирования и биоинформатического анализа нами продемонстрирована принципиальная возможность дизайна биосенсоров для детекции нуклеиновых кислот патогенов на основе связывания одновременно двух CRISPR-dCas9-комплексов с целевым локусом ДНК. При этом детекция сигнала в предлагаемой конструкции происходит за счет взаимодействия доменов репортерной системы, пришитых к dCas9-белкам. Такого рода биосенсоры представляются перспективными, поскольку легко программируются для связывания с заданными локусами ДНК путем задания гРНК нужной последовательности. Предлагаемый подход относится к развивающемуся широкому спектру различных подходов детекции нуклеиновых кислот, использующих способность Cas-белков программируемым образом узнавать последовательности ДНК или РНК [23]. Наибольшей степени практической проработанности на данный момент достигли системы SHERLOCK и DETECTR, использующие коллатеральную активность ферментов Cas12, Cas13, Cas14 [5, 24]. Однако существуют и разработки, связанные с использованием ферментативной активности Cas9-белков или их вариаций, например, CRISDA [25], RACE [26], CASLFA [27]. В сравнении с этими системами исследованный в данной статье подход обладает рядом функциональных особенностей. Так, ферментативная активность Cas-белков обычно более чувствительна к наличию несоответствий между последовательностью спейсера и связанным участком ДНК, чем их способность к связыванию с заданным локусом. Таким образом, в нашем варианте системы детекции сильнее будут проявляться возможные нецелевые эффекты на уровне связывания одного dCas9-белка. Однако данное уменьшение специфичности может компенсироваться за счет необходимости одновременного связывания двух dCas9-белков в соседних местах. Их взаимодействие через репортерные сплит-домены будет приводить к наличию кооперативного эффекта при связывании двух dCas9-белков, что в свою очередь будет улучшать соотношение сигнал/шум при регистрации конечного сигнала. Использование пар высокоточных Cas9-белков [28], в теории, также позволит дополнительно увеличить точность данной системы. Использование колориметрической реакции

в предлагаемой системе ухудшает предел детекции по сравнению с системами, в которых используются флуоресцентные зонды, но дает ряд преимуществ за счет удешевления системы благодаря отсутствию зондов и необходимости использования сложного оборудования. Отсутствие в конструкции биосенсора синтетических компонентов также открывает возможности его интеграции в регуляторные генетические схемы, реализуемые внутри живых организмов. Высокая специфичность связывания Cas9-белков открывает перспективы обнаружения однонуклеотидных замов, что является актуальной задачей при

детекции вирусных гаплотипов (например, вариантов SARS-Cov-2).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-51053). Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacKay M.J., Hooker A.C., Afshinnikoo E. et al. The COVID-19 XPRIZE and the need for scalable, fast, and widespread testing: 9 // Nat. Biotechnol. 2020. Vol. 38. N 9. P. 1021–1024.
2. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28. N 12: e63.
3. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J. et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants // Nat. Rev. Microbiol. 2020. Vol. 18. N 2. P. 67–83.
4. Kellner M.J., Koob J., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases // Nat. Protoc. 2019. Vol. 14. N 10. P. 2986–3012.
5. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 // Science. 2018. Vol. 360. N 6387. P. 439–444.
6. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // TrAC Trends Anal. Chem. 2018. Vol. 98. P. 19–35.
7. Li Y., Li S., Wang J., Liu G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing // Trends Biotechnol. 2019. Vol. 37. N 7. P. 730–743.
8. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression // Cell. 2013. Vol. 152. N 5. P. 1173–1183.
9. Zhang L., Rube H.T., Bussemaker H.J., Pufall M.A. The effect of sequence mismatches on binding affinity and endonuclease activity are decoupled throughout the Cas9 binding site // BioRxiv. 2017: 176255.
10. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis // J. Comput. Chem. 2004. Vol. 25. N 13. P. 1605–1612.
11. Huai C., Li G., Yao R., Zhang Y., Cao M., Kong L., Jia C., Yuan H., Chen H., Lu D., Huang Q. Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system: 1 // Nat. Commun. 2017. Vol. 8. N 1: 1375.
12. Gowers R., Linke M., Barnoud J., Reddy T., Melo M., Seyler S., Domarinski J., Dotson D., Buchoux S., Kenney I., Beckstein O. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations // Proceedings of the 15th Python in Science Conference. Austin: SciPy, 2016. P. 98–105.
13. Harris C.R., Millman K.J., van der Walt S.J. et al. Array programming with NumPy: 7825 // Nature. 2020. Vol. 585. N 7825. P. 357–362.
14. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment // Comput. Sci. Eng. 2007. Vol. 9. N 3. P. 90–95.
15. Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. Database issue. P. D61–D65.
16. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Brief. Bioinform. 2019. Vol. 20. N 4. P. 1160–1166.
17. Wehr M.C., Rossner M.J. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies // Drug Discov. Today. 2016. Vol. 21. N 3. P. 415–429.
18. Azad T., Tashakor A., Hosseinkhani S. Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives // Anal. Bioanal. Chem. 2014. Vol. 406. N 23. P. 5541–5560.
19. Porter J.R., Stains C.I., Segal D.J., Ghosh I. Split beta-lactamase sensor for the sequence-specific detection of DNA methylation // Anal. Chem. 2007. Vol. 79. N 17. P. 6702–6708.
20. Chen X., Zaro J., Shen W.-C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality // Adv. Drug Deliv. Rev. 2013. Vol. 65. N 10. P. 1357–1369.
21. Soranno A., Longhi R., Bellini T., Buscaglia M. Kinetics of contact formation and end-to-end distance distributions of swollen disordered peptides // Biophys. J. 2009. Vol. 96. N 4. P. 1515–1528.
22. Zhao S., Lou J., Cao L., Zheng H., Chong M.K.C., Chen Z., Chan R.W.Y., Zee B.C.Y., Chan P.K.S., Wang M.H. Quantifying the transmission advantage associated with N501Y substitution of SARS-CoV-2 in the United Kingdom: An early data-driven analysis // J. Travel Med. 2021. Vol. 28. N 2: taab011.
23. Wang M., Zhang R., Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods // Biosens. Bioelectron. 2020. Vol. 165: 112430.

24. Broughton J.P., Deng X., Yu G. et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 // *Nat. Biotechnol.* 2020. Vol. 38. N 7. P. 870–874.

25. Zhou W., Hu L., Ying L., Zhao Z., Chu P.K., Yu X.-F. A CRISPR–Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection: 1 // *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. N 1: 5012.

26. Wang R., Zhao X., Chen X., Qiu X., Qing G., Zhang H., Zhang L., Hu X., He Z., Zhong D., Wang Y., Luo Y. Rolling circular amplification (RCA)-Assisted CRISPR/Cas9 cleavage (RACE) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle MicroRNAs // *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92. N 2. P. 2176–2185.

27. Wang X., Xiong E., Tian T., Cheng M., Lin W., Wang H., Zhang G., Sun J., Zhou X. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay // *ACS Nano.* 2020. Vol. 14. N 2. P. 2497–2508.

28. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science.* 2016. Vol. 351. N 6268. P. 84–88.

Поступила в редакцию 11.02.2021 г.

После доработки 28.03.2021 г.

Принята в печать 12.04.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Design of nucleic acid biosensors based on CRISPR/Cas systems and reporter split-proteins

R.V. Novikov^{1,2,#}, A.K. Gribkova^{1,2,#}, J.G. Kacher^{1,2,#}, P.A. Zaytsev^{1,2}, G.A. Armeev^{1,2}, G.S. Gluhov^{1,2}, A.K. Shaytan^{1,2,3,*} 

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

²«Sirius» University of Science and Technology, 1 Olympic Ave, Sochi, 354340, Russia;

³HSE University, 11 Pokrovsky boulevard, Moscow, 109028, Russia

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

– contributed equally

For the diagnosis of many humans, animals and plant diseases, environmental monitoring, highly sensitive, specific, fast and easy-to-use diagnostic methods for the detection of nucleic acids of pathogens are required. Alternative to the PCR method, which requires expensive laboratory equipment, approaches based on the use of the natural ability of bacterial CRISPR/Cas9 systems to recognize DNA sequences with high specificity under isothermal conditions. The development of methods for signal registration during the formation of a DNA/RNA/Cas9-protein complex is a separate bioengineering task. In this work, we have designed and studied the applicability of a biosensor system based on a combination of the ability of dCas9-proteins to bind to target DNA sequences (without cutting them) and the capabilities of reporter split-enzymes for detecting spatial colocalization of protein complexes. Using molecular modeling methods we determined possible mutual positions of two dCas9-proteins at the target locus of genomic DNA, which allow optimal interaction of the domains of the split-enzyme attached to them. The optimal distances between the DNA binding sites of dCas9-proteins in different orientations were determined; the dependence of the system structure on the distance between the binding sites of dCas9-proteins was modeled. The genomes of a number of bacteria and viruses (including SARS-CoV-2) have been analyzed using bioinformatics methods, the possibility of targeting the dCas9-protein pairs to specific genomic loci in optimal positions has been shown. The possibility of using dCas9-proteins from various bacteria differing by PAM-sequences was analyzed. Our results indicate the conceptual possibility of creating highly specific biosensors of nucleic acids based on a combination of CRISPR/Cas9 technologies and enzymatic protein split systems.

Keywords: biosensors, CRISPR/Cas, nucleic acids, split-proteins, beta-lactamase, molecular modeling, genomic analysis

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 19-34-51053.

Сведения об авторах

Новиков Роман Вячеславович — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: novikov.roman.2017@post.bio.msu.ru

Грибкова Анна Кирилловна — аспирантка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gribkova.anna.2013@post.bio.msu.ru

Качер Юлия Германовна — магистр кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: kacher.julia.2015@post.bio.msu.ru

Зайцев Петр Андреевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: zaitsev@mail.bio.msu.ru

Армеев Григорий Алексеевич — канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: armeev@mail.bio.msu.ru

Глухов Григорий Сергеевич — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gluhovg@gmail.com

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0312-938X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.261.1+574.9

Репродуктивная совместимость европейских популяций у двух видов
Ulnaria (Bacillariophyta)Ю.А. Подунай* , О.И. Давидович , Н.А. Давидович 

Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук,
филиал Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского, Российская академия наук,
Россия, 2988188, г. Феодосия, п. Курортное, ул. Науки, д. 24

*e-mail: yu.podunai@yandex.ru

Из проб, отобранных на территории Европы, изолированы в культуру клоны двух морфотипов, соответствующих двум видам пennisных бесшовных диатомовых водорослей — *Ulnaria ulna* и *U. acus*. Клоновые культуры вступили в гетероталлическое половое воспроизведение в комбинациях, соответствующих их типам спаривания. Следуя концепции биологических видов, мы проверили репродуктивную совместимость между всеми представителями географически удаленных популяций. Изолированные клоны в пределах каждого из видов оказались репродуктивно совместимыми, потомки (поколение F1) были жизнеспособными и фертильными, свободно вступая в возвратное скрещивание. Случаев межвидовой гибридизации не обнаружено. Отсутствие внутривидовой репродуктивной изоляции между удаленными популяциями у этих двух видов позволяет говорить о конспецифичности популяций как *U. ulna*, так и *U. acus*.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, популяция, биогеография, жизненный цикл, система скрещивания, репродуктивная совместимость

Род *Ulnaria* (Kützinger) Compère был описан для группы пресноводных видов диатомей, которые ранее были отнесены к большому и гетерогенному роду *Synedra* Ehrenberg [1]. В настоящее время известно 44 вида рода *Ulnaria* [2], типовым видом является *U. ulna* (Nitzsch) P. Compère. Бентосная диатомовая водоросль *U. ulna*, выделена немецким естествоиспытателем Х.Л. Нитцшем в 1817 г. как *Bacillaria ulna*, типовой местностью являются донные иловые отложения Виттенбергского рва (Германия) [3]. Вид рассматривался в родах *Navicula* Bory, *Frustulia* Rabenhorst, *Exilaria* Greville, *Fragilaria* Lyngbye, *Synedra* Ehrenberg [4]. В 2001 г. был выделен род *Ulnaria* (Kütz.) Compère, в котором *U. ulna* стал типовым видом. Вид обитает в пресноводных и солоноватых водоемах Европы, Юго-Западной и Юго-Восточной Азии, Северной и Южной Америки, Австралии и Новой Зеландии [2].

Пресноводная бесшовная диатомовая водоросль *U. acus* (Kützinger) Aboal [5] является одним из доминирующих видов фитопланктона и фитобентоса многих пресных водоемов. В настоящее время необходимо рассматривать *U. ulna* и *U. acus* в широком смысле, поскольку эти видовые комплексы, как и весь род *Ulnaria*, подвергается тщательной ревизии с типификацией видов [3], с выделением новых видов, как например, *U. ferefusiformis* Kulikovskiy & Lange-Bert., *U. pilum* Kulikovskiy & Lange-Bert. [6], *U. verhaegeniana* Van de Vijver, M. de

Haan, Mertens & Cocquyt [7], с перемещениями видов между родами *Ulnaria* и *Fragilaria* Lyngb. [8]. Однако описание новых видов зачастую идет только на основании небольших отличий по морфологическим признакам или даже одному признаку. Выделение таких морфовидов не учитывает ни достаточно широкий диапазон варьирования морфологических признаков [9], ни политипичность видов, которые приводят к возникновению трудностей в определении видовых границ. В таких случаях на первый план должен выходить комплексный подход к описанию видов, который будет включать в себя морфологические и молекулярно-генетические критерии, а также изучение скрещиваемости/нескрещиваемости популяций.

Широкое распространение *U. ulna* и *U. acus* несомненно ставит вопрос о том, действительно ли эти виды являются космополитами или под одним и тем же названием может скрываться целый комплекс видов. Обширная группа диатомовых водорослей содержит, с одной стороны, космополитические, широко распространенные виды [10], с другой — видовые комплексы, содержащие криптические и псевдокриптические виды [11]. Для разрешения проблемы понимания видовых границ и степени расхождения популяций, обитающих в географически удаленных водоемах, используются морфологические и молекулярные методы, а также методы репродуктивной биологии, основанные на биологической концепции вида

[12]. Изучение механизмов и степени репродуктивной изоляции в сочетании с методами молекулярно-генетического анализа дает возможность разграничить криптические виды.

Половое воспроизведение и система скрещивания *U. ulna* и *U. acus* изучены и описаны [13–15], что позволяет использовать эти виды для изучения репродуктивных барьеров между популяциями. Настоящая работа посвящена вопросу наличия или отсутствия репродуктивной изоляции между клоновыми культурами, полученными из водоемов Европы.

Материал и методы

Клетки, относящиеся к морфотипу *Ulnaria ulna*, были изолированы из проб, отобранных с 2009 по 2013 гг. в водоемах европейской части Евразийского континента: маленькой речке в г. Кардифф (Великобритания), канале в г. Гент (Бельгия), реке Сарт (La Sarthe, г. Ле-Ман, Франция), реке Днепр (г. Киев, Украина), горном ручье в Крыму и Москве-реке в г. Звенигород (Россия). Клоны *U. acus* были выделены из проб, отобранных в реке Эрдр (L'Erdre, г. Нант, Франция) и озере Рица (Абхазия) в разное время с 2015 по 2020 гг. Расстояние между популяциями измерено с помощью ресурса Google Maps (<https://www.google.ru/maps/>). Пробы отобраны путем соскоба обрастаний с камней и талломов макрофитов.

Клетки для клоновых культур выделяли микропипеточным методом [16], очищая с помощью многократного пересева в свежую среду. Культуры содержали на среде, близкой по составу к среде Dm (с увеличенной концентрацией силиката натрия и витаминов группы В) [17]. Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 5–9 см, высотой 0,9–1,4 см при наполнении средой в объеме от 8 до 45 мл соответственно размеру чашки. Экспоненциальную фазу роста поддерживали еженедельным пересевом в свежую питательную среду. Монокультуры постоянно просматривали под микроскопом на предмет обнаружения случаев гомоталлического воспроизведения. Чашки находились в изолированной комнате при естественном освещении у окна, обращенного на север. Для наблюдения и манипуляций использовали микроскоп Nib-100 (Китай), для фотографирования — микроскоп Biolar PI (PZO, Польша), настроенный по методу дифференциально-интерференционного контраста и освещения по Кёлеру [18]. Фотографии выполнены с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640. Размер клеток определяли с помощью окулярной линейки, калиброванной по объект-микрометру. Морфологию створок диатомей изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), электронные микрофотографии получали в центре коллективного пользования Института биологии внутренних вод

имени И.Д. Папанина Российской академии наук на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6510LV (Jeol, Япония). Терминология используется в соответствии со словарями [19, 20].

Результаты и обсуждение

Клетки, соответствующие морфотипу *U. ulna*, были изолированы из шести европейских популяций. Самые отдаленные популяции (Кардифф, Великобритания и Москва-река, Звенигород) расположены на расстоянии около 2650 км, самые близкие (Ле-Ман, Франция и Гент, Бельгия) — 420 км. В естественных популяциях *U. ulna* росла либо отдельными клетками, либо группами клеток, прикрепленными к субстрату с помощью общей слизистой подушки, реже встречалась в планктоне. В культурах, если условия были хорошими, быстрорастущие клоны образовывали колонии на дне чашек Петри.

Клетки *U. ulna* палочковидные, створки линейные, немного сужающиеся к концам. Вставочные ободки обычно имеются. На каждом из концов створки по одной римопортуле, они располагаются на стернуме под углом к апикальной оси. Римопортула обычно две, может быть одна. С наружной стороны панциря римопортулы открываются эллипсоидным отверстием. Осевое поле узкое, линейное (рис. 1). Центральное поле прямоугольное, может содержать слабо заметные следы штрихов или отсутствовать. Плотность расположения штрихов 5–9 в 10 мкм. Достоверных морфологических отличий между популяциями не отмечено [9].

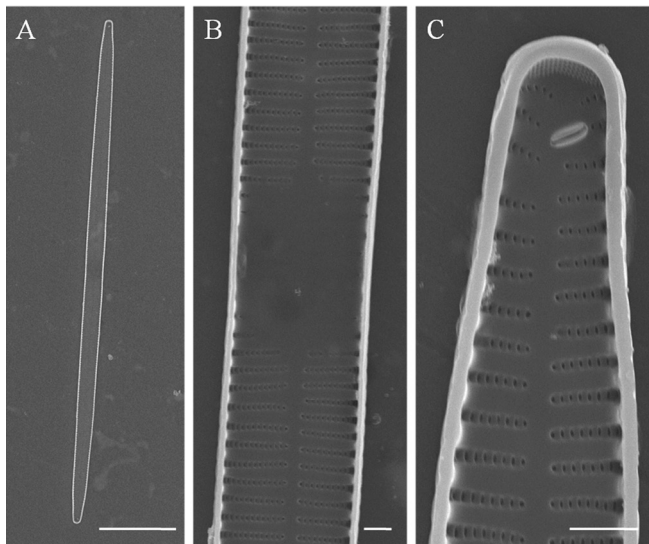


Рис. 1. Микрофотографии внутренней стороны створок *Ulnaria ulna* из французской популяции (СЭМ). Масштаб — 50 мкм (А); 2 мкм (В, С)

Была измерена апикальная длина клеток в популяциях на момент отбора проб (табл. 1). Ни в одной из популяций не встречались клетки с размером, близким к максимальному видоспецифическому [14], и во всех популяциях присут-

ствовали клетки, размер которых позволял вступить в половое воспроизведение.

Таблица 1

Апикальная длина клеток *Ulnaria ulna* в пробах из европейских популяций

Место обитания	Время отбора проб	Средняя апикальная длина, мкм	Диапазон размеров, мкм
г. Кардифф, Уэльс	Апрель, 2012	148,0±3,2 N = 104	62,3–235,3 N = 104
г. Гент, Бельгия	Ноябрь, 2012	146,0±4,9 N = 72	81,6–283,7 N = 72
г. Ле-Ман, Франция	Декабрь, 2012	203,0±6,2 N = 40	110,7–249,1 N = 40
Крым, Россия	Апрель, 2010	91,4 ± 2,4 N = 658	11,2–176,0 N = 658
г. Звенигород, Россия	Сентябрь, 2012	188,0±4,6 N = 144	90,0–290,6 N = 144

Примечание: средние значения представлены как среднее ± ошибка среднего; N – количество измерений

Клоны, изолированные из всех изученных популяций, оказались способными к гетероталлическому воспроизведению в своих группах, а также межпопуляционному скрещиванию. Всего в половое воспроизведение вступило 32 клон, часть из них представлены в табл. 2. Изученные клоны свободно скрещивались (рис. 2) в комбинациях соответственно своему половому типу, особенности полового воспроизведения соответствовали описанному ранее для *U. ulna* [14]. Поскольку

у представителей *Ulnaria* мужские и женские гаметы различаются морфологически и по поведению, можно вести речь о двух полах, а не типах спаривания. Клоны из европейских популяций дали жизнеспособное и фертильное потомство, которое в свою очередь также успешно скрещивалось между собой и с родительскими клонами, что свидетельствует о полном отсутствии репродуктивной изоляции между этими популяциями.

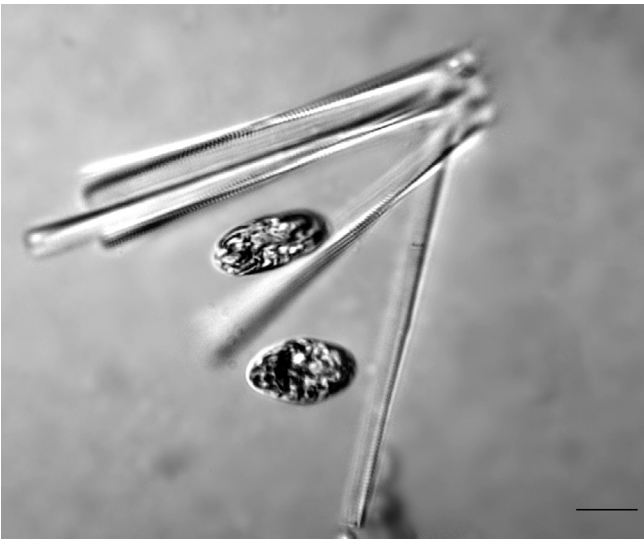


Рис. 2. Ауксоспоры *Ulnaria ulna* на ранних этапах развития. Межпопуляционное воспроизведение подтверждается разными размерами клеток в клонах, используемых для скрещивания. Масштаб – 20 мкм

Таблица 2

Репродуктивная совместимость клонов из европейских популяций *Ulnaria ulna*

Популяция	Имя клона		2.0419-J	2.0423-C	2.0419-A	2.0419-C	2.0903-A	2.0903-E	2.0903-H	2.1130-C	2.1130-H	2.1130-D	2.1130-E	9.0427-B	0.0421-A	9.0424-E	0.0416-C	0.0513-B	0.0513-A	0.0513-C	1.0929-F	1.0929-A	1.0929-D	1.0929-G
		Пол	F	F	M	M	F	M	M	F	F	M	M	F	F	M	M	F	M	M	F	F	M	M
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-J	F																						
г. Кардифф, Уэльс	2.0423-C	F	0																					
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-A	M	3	2																				
г. Кардифф, Уэльс	2.0419-C	M	2	2	0																			
г. Гент, Бельгия	2.0903-A	F	0	0	3	3																		
г. Гент, Бельгия	2.0903-E	M	2	2	0	0	3																	
г. Гент, Бельгия	2.0903-H	M	3	2	0	0	2	-																
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-C	F	0	0	3	-	-	2	2															
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-H	F	0	0	2	2	0	1	3	-														
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-D	M	3	2	0	0	2	-	-	2	2													
г. Ле-Ман, Франция	2.1130-E	M	2	2	0	-	2	0	0	2	2	0												
Крым, Россия	9.0427-B	F	0	0	2	2	0	2	-	0	0	2	3											
Крым, Россия	0.0421-A	F	0		1	2	0	3	-	0	0	2	3	0										
Крым, Россия	9.0424-E	M	3	2	0	0	3	0	-	2	2	0	0	1	2									
Крым, Россия	0.0416-C	M	2	3	0	0	3	0	-	2	2	0	0	2	3	0								
г. Киев, Украина	0.0513-B	F	0	0	-	3	0	2	-	0	0	3	3	0	0	3	3							
г. Киев, Украина	0.0513-A	M	-	2	0	0	-	-	-	3	2	2	0	-	2	—	1	2						
г. Киев, Украина	0.0513-C	M	2	2	0	0	2	0	0	2	1	0	0	2	3	0	2	2	0					
г. Звенигород, Россия	1.0929-F	F	0	0	2	2	0	2	3	0	0	2	3	0	0	2	2	0	—	2				
г. Звенигород, Россия	1.0929-A	F	0	0	-	2	0	2	2	0	-	2	-	-	-	2	3	0	-	2	0			
г. Звенигород, Россия	1.0929-D	M	2	2	0	0	2	0	0	2	3	0	0	-	2	-	0	3	0	0	2	3		
г. Звенигород, Россия	1.0929-G	M	2	2	0	0	-	0	0	-	-	0	0	2	3	-	0	2	0	0	3	3	0	

Примечание: частота (обилие) случаев воспроизведения оценена в баллах: 0 – нет воспроизведения, 1 – редкие случаи, 2 – нередко, 3 – массовое воспроизведение, - – не проверяли; F – клоны женского пола, M – клоны мужского пола.

Клетки *U. acus* обнаружили в пробах, отобранных на расстоянии примерно 3280 км друг от друга (оз. Рица, Абхазия – г. Нант, Франция). По морфологии вегетативные клетки обеих популяций соответствуют *U. acus*, они прикрепляются к субстрату одним концом с помощью слизи, располагаясь по одной клетке или образуя небольшие колонии. Достаточно большое количество клеток остается неприкрепленным к субстрату, находясь в среде во взвешенном состоянии. Клетки вытянутые, имеют узко-ланцетную форму створок. На концах створки, так же, как и у *U. ulna*, находится по одной римопортуле, которые располагаются на стернуме под углом к апикальной оси. С наружной стороны панциря римопортулы открываются эллипсоидным отверстием. Осевое поле узкое, иногда неровное, центральное поле прямоугольное (рис. 3). Штрихов 9–13 в 10 мкм.

Все изученные клоны *U. acus* оказались способными к гетероталлическому половому воспроиз-

изведению при внутрипопуляционных и межпопуляционных скрещиваниях в смесях клонов противоположного пола (табл. 3), соответственно своему половому типу [15]. Таким образом, никаких очевидных презиготических барьеров не было обнаружено между клонами в обеих популяциях.

Для описания новых видов из рода *Ulnaria* используется обычно ряд следующих основных морфологических критериев: длина и ширина створки клетки, плотность расположения штрихов, наличие и количество римопортул, форма створок, а также форма осевого и центрального поля. Видоспецифический апикальный размер клеток при этом часто оказывается заниженным, так как не берется во внимание биология вида и фаза жизненного цикла, в которой на момент описания находится клетка, тогда как важно учитывать, что в результате полового воспроизведения размер клеток может увеличиваться в несколько раз [14, 15].

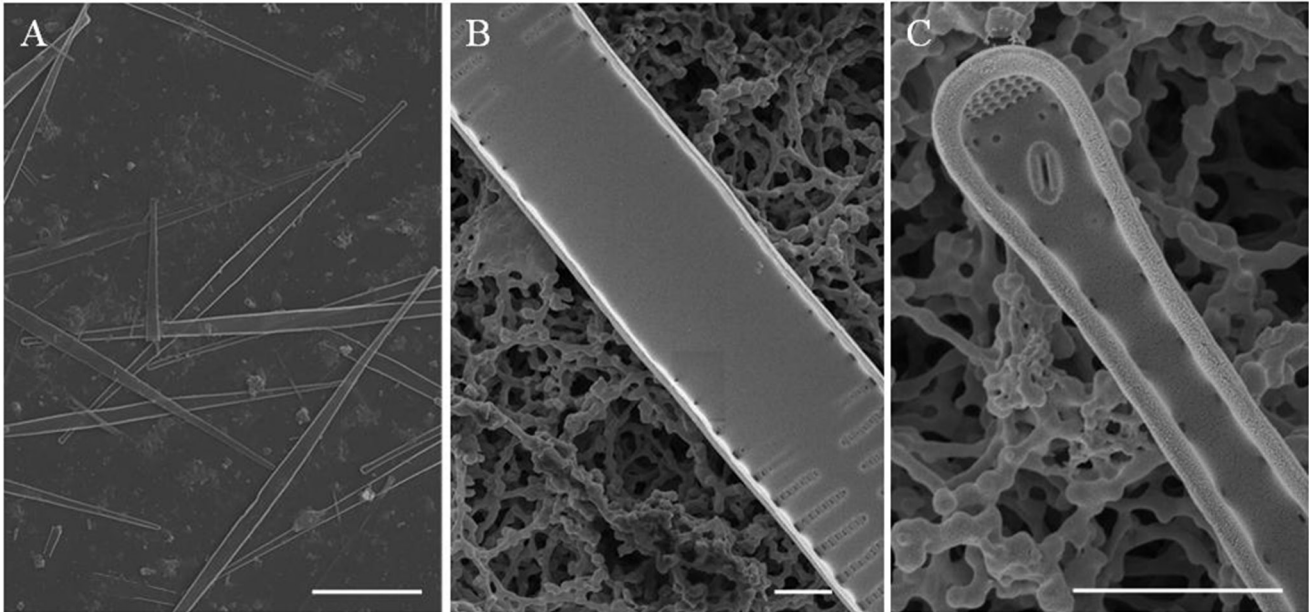


Рис. 3. Внутренняя сторона створок *Ulnaria acus* из озера Рица (СЭМ). Масштаб – 50 мкм (А); 2 мкм (В, С)

Таблица 3

Репродуктивная совместимость клонов из двух популяций *Ulnaria acus*

Популяция	Наименование клона		R 5.1015-B	R 5.1015-D	R 5.1015-C	0.0224-OE	0.0224-OD	0.0224-OJ	0.0304-YC	0.0304-YD	0.0316-YE
		Пол	F	F	M	F	F	F	F	F	M
оз. Рица, Абхазия	R 5.1015-B	F									
оз. Рица, Абхазия	R 5.1015-D	F	0								
оз. Рица, Абхазия	R 5.1015-C	M	3	3							
р. Эрдр, Франция	0.0224-OE	F	0	0	2						
р. Эрдр, Франция	0.0224-OD	F	0	0	2	0					
р. Эрдр, Франция	0.0224-OJ	F	0	0	3	0	0				
р. Эрдр, Франция	0.0304-YC	F	0	0	3	0	0	0			
р. Эрдр, Франция	0.0304-YD	F	0	0	3	0	0	0	0		
р. Эрдр, Франция	0.0316-YE	M	3	2	0	3	3	1	3	3	

Примечание: частота (обилие) случаев воспроизведения оценена в баллах: 0 – нет воспроизведения, 1 – редкие случаи, 2 – нередко, 3 – массовое воспроизведение, F – клоны женского пола, M – клоны мужского пола

Была показана широкая внутривидовая вариабельность таких признаков, как плотность расположения штрихов, ширина клеток, частота расположения ареол для многих диатомовых, например, *Nitzschia rectilonga* Takano [21], *Tabularia fasciculata* (C.A. Agardh) Williams & Round [22]. Для вида *T. fasciculata*, близкородственного к *Ulnaria* [23], отмечено, что существенные различия по морфологическим критериям могут не являться основанием для разграничения видов, так как репродуктивные барьеры между двумя морфологическими группами отсутствовали [22]. Также и европейские популяции *U. ulna*, несмотря на некоторые морфологические различия, свободно скрещиваются между собой.

Одним из критериев описания видов рода *Ulnaria* является форма колоний [8], однако наблюдения за клоновыми культурами *U. acus* показывают, что в зависимости от стадии жизненного цикла клетки могут вести себя по-разному. В дорепродуктивной фазе жизненного цикла, когда клетки имеют большую длину, они в основном находятся в среде во взвешенном состоянии, лишь часть клеток оседает на дно. При достижении клетками приблизительно половины максимально видоспецифического размера и готовности вступать в половой процесс большая часть клеток встречается на дне, образуя плотные колонии, содержащие от нескольких до десятков клеток. В смешанном посеве в одной колонии часто оказывались клетки разных клонов, в которых в большинстве и наблюдали половое воспроизведение (рис. 4).

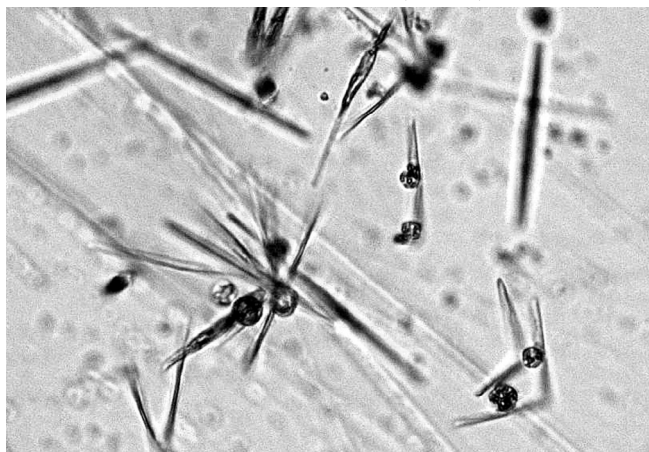


Рис. 4. Процесс полового воспроизведения *Ulnaria acus* в смешанном посеве клонов из двух популяций. Масштаб — 50 мкм

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Compère P. *Ulnaria* (Kütz.) Compère, a new genus name for *Fragilaria* subgen. *Altera-synedra* Lange-Bertalot with comments on the typification of *Synedra* Ehrenb. // Lange-Bertalot Festschrift. Studies on diatoms dedicated to Prof. Dr. h.c. Horst Lange-Bertalot on the occasion of his 65th birthday / Eds. R. Jahn, J.P. Kociolek, A. Witkowski, and P. Compère. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001. P. 97–101.
2. AlgaeBase [Электронный ресурс]. 2021. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения: 26.01.2021).

Если говорить о генетической границе между видами, можно отметить, что даже при наличии достаточно большого генетического расстояния между популяциями, может отмечаться их полная репродуктивная совместимость, например, как у *T. fasciculata* [22] и *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle [10]. У *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle и *P. arenysensis* S. Quijano-Scheggia, E. Garcés & N. Lundholm in Quijano-Scheggia et al. [24] были установлены случаи межвидовой гибридизации. Однако, как отметили авторы, из всех клонов с известным типом спаривания только у 10% спаривания были успешными, а из 60 изолированных постинициальных клеток только одна смогла поделиться и сформировать жизнеспособный клон. В случае с изучаемыми нами видами *Ulnaria* все скрещивания репродуктивно совместимых клонов оказались успешными, а изолированные потомки от межпопуляционного скрещивания были жизнеспособными и фертильными. В смешанных посевах *U. ulna* и *U. acus* не было обнаружено случаев межвидовой гибридизации.

Таким образом, показано широкое распространение *Ulnaria ulna* и *U. acus* на европейской части Евразийского континента. Отсутствие внутривидовой репродуктивной изоляции между удаленными популяциями у этих двух видов позволяет, опираясь на биологическую концепцию вида, говорить о консpezifичности популяций как *U. ulna*, так и *U. acus*.

Исследование выполнено в рамках госзадания Карадагской научной станции имени Т.И. Вяземского — природного заповедника Российской академии наук, филиала Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук «Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов», номер гос. регистрации 121032300019-0. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

3. Lange-Bertalot H., Ulrich S. Contributions to the taxonomy of needle-shaped *Fragilaria* and *Ulnaria* species // *Lauterbornia*. 2014. Vol. 78. P. 1–73.

4. Morales E.A., Hamsher S.E., Manoylov K.M., Gillett N., Hamilton P.B., Potapova M.M., Ponader K.C., Winter D.M., Spaulding S., Hagan E.E., Lavoie I. *Synedra ulna* (Nitzsch) Ehrenb. and allies from rivers in the United States // Thirteenth NAWQA Workshop on Harmonization of Algal Taxonomy (9–12 December 2004, Rep. N 07-03.) /

Eds. E.A. Morales, S.H. Hamsher, and J.M.W. Mantell. Philadelphia, 2007. P. 6–29.

5. Aboal M., Alvarez Cobelas M., Cambra J., Ector L. Floristic list of non-marine diatoms (Bacillariophyceae) of Iberian Peninsula, Balearic Islands and Canary Islands. Updated taxonomy and bibliography // *Diatom Monographs*, vol.4 / Ed. A. Witkowski. Germany: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2003. 639 pp.

6. Kulikovskiy M., Lange–Bertalot H., Annenkova N., Gusev E., Kocielek J.P. Morphological and molecular evidence support description of two new diatom species from the genus *Ulnaria* in Lake Baikal // *Fottea*, Olomouc. 2016. Vol. 16. N 1. P. 34–42.

7. Van de Vijver B., De Haan M., Mertens A., Cocquyt C. *Ulnaria verhaegeniana*, a new diatom (Bacillariophyta) species from Belgium // *Phytotaxa*. 2017. Vol. 326. N 3. P. 221–226.

8. Van de Vijver B., Alexson E.E., Reavie E.D., Straub F., Jónsson G.S., Ector L. Analysis of the type of *Synedra acus* var. *ostenfeldii* (Bacillariophyta) and its transfer to the genus *Fragilaria* // *Botany Letters*. 2021. Vol. 168. N 1. P. 85–95.

9. Подунай Ю.А., Шоренко К.И., Андреева С.А., Давидович Н.А. Морфологическая вариабельность клонов *Ulnaria ulna* (Bacillariophyceae) из удаленных популяций Евразийского континента [Электронный ресурс] // *Вопр. совр. альгол.* 2017. № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1103> (дата обращения: 21.01.2021).

10. Casteleyn G., Chepurnov V.A., Leliaert F., Mann D.G., Bates S.S., Lundholm N., Rhodes L., Sabbe K., Vyverman W. *Pseudo-Nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): a cosmopolitan diatom species? // *Harmful Algae*. 2008. Vol. 7. N 2. P. 241–257.

11. Mann D.G., Thomas S.J., Evans K.M. Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles // *Fottea*, Olomouc. 2008. Vol. 8. N 1. P. 15–78.

12. Mayr E. Populations, species, and evolution. Cambridge: Belknap Press, 1970. 453 pp.

13. Geitler L. Gameten- und Auxosporenbildung von *Synedra ulna* im Verleichen mit anderen pennaten Diatomeen // *Planta, Archiv für wissenschaftliche Botanik*. 1939. Vol. 30. N. 3. P. 551–566.

14. Podunay Yu.A., Davidovich O.I., Davidovich N.A. Mating system and two types of gametogenesis in the fresh

water diatom *Ulnaria ulna* (Bacillariophyta) // *Algologia*. 2014. Vol. 24. N 1. P. 3–19.

15. Подунай Ю.А., Давидович Н.А., Куликовский М.С., Гусев Е.С. Особенности полового воспроизведения и система скрещивания *Ulnaria acus* (Bacillariophyta) // *Журн. Сиб. фед. ун-та. Сер. биол.* 2018. Т. 11. № 1. С. 75–87.

16. Andersen R.A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques // *Algal culturing techniques* / Eds. R.A. Andersen. L.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 83–100.

17. Mann D.G., Chepurnov V.A. What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematic // *Nova Hedwigia*. 2004. Vol. 79. N 1–2. P. 237–291.

18. Федин Л.А., Барский И.Я. *Микрофотография*. Л.: Наука, 1971. 220 с.

19. Давидович Н.А. Определения и понятия репродуктивной биологии диатомовых водорослей (терминологический словарь) // *Новости сист. высш. раст.* 2017. Т. 51. С. 71–105.

20. Гогорев Р.М., Чудаев Д.А., Степанова В.А., Куликовский М.С. Русский и английский терминологический словарь по морфологии диатомовых водорослей // *Новости сист. высш. раст.* 2018. Т. 52. Ч. 2. С. 265–309.

21. Shorenko K.I., Davidovich N.A., Kulikovskiy M.S. The variability of the morphological and structural elements of the frustule in genetically homogeneous and heterogeneous groups of the diatom *Nitzschia rectilonga* Takano, 1983 (Bacillariophyta) // *Russ. J. Mar. Biol.* 2014. Vol. 40. N 5. P. 354–363.

22. Kaczmarek I., Ehrman J.M., Moniz M.B.J., Davidovich N. Phenotypic and genetic structure of interbreeding populations of the diatom *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta) // *Phycologia*. 2009. Vol. 48. N 5. P. 391–403.

23. Williams D.M., Round F.E. Revision of the genus *Synedra* Ehrenb // *Diatom Res.* 1986. Vol. 1. N 2. P. 313–339.

24. Amato A., Orsini L. Rare interspecific breeding in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) // *Phytotaxa*. 2015. Vol. 271. N 2. P. 145–154.

Поступила в редакцию 16.02.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята в печать 26.04.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Reproductive compatibility of European populations of two species of *Ulnaria* (Bacillariophyta)

Y.A. Podunay* , O.I. Davidovich , N.A. Davidovich 

Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of Russian Academy of Sciences, Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, ul. Nauki 24, p. Kurortnoe, 298188, Feodosiya, Russia

*e-mail: yu.podunai@yandex.ru

Clones of two morphotypes corresponding to two species of pennate araphids diatoms, *Ulnaria ulna* and *U. acus*, were isolated from samples taken in Europe. Clonal cultures entered heterothallic sexual reproduction in combinations appropriate to their mating types.

Following the concept of biological species, we tested reproductive compatibility between all representatives of geographically distant populations. Isolated clones turned out to be reproductively compatible within the limits of each of the species, the progeny (generation F1) were viable and fertile, freely entering into backcrossing. No cases of interspecies hybridization were found. The absence of intraspecific reproductive isolation between distant populations in these two species suggests that the populations of both *U. ulna* and *U. acus* are conspecific.

Keywords: *diatoms, population, biogeography, life cycle, mating system, reproductive compatibility*

Funding: This study was performed under the state assignment of Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of Russian Academy of Sciences, project number 121032300019-0.

Сведения об авторах

Подунай Юлия Александровна – науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН, филиал Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: grab-ua@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0519-2908>

Давидович Ольга Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН, филиал Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: olivdav@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0003-3024-0104>

Давидович Николай Александрович – докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН, филиал Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: karadag-algae@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3510-0453>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

Калиевые токи входящего выпрямления I_{K1} и I_{KACH} в рабочем миокарде японского перепела (*Coturnix japonica*)**Т.С. Филатова^{1,2,3,*} , Д.В. Абрамочкин^{1,2,3} **¹*Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Лаборатория электрофизиологии сердца, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Россия, 121552, г. Москва, ул. Черепковская 3-я, д. 15а;*³*Кафедра физиологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1***e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru*

Несмотря на то, что эмбрионы птиц широко используются в исследованиях, клеточные и молекулярные аспекты физиологии сердца взрослых птиц изучены слабо. Недавние исследования показали, что, несмотря на отдаленное систематическое положение, набор реполяризирующих калиевых токов в сердце птиц напоминает таковой у млекопитающих и, в частности, у человека, что позволяет считать птиц потенциальным модельным объектом в экспериментальной кардиологии. Данное исследование впервые характеризует калиевые токи входящего выпрямления в рабочем миокарде перепела. С помощью метода пэтч-кламп в изолированных предсердных и желудочковых миоцитах перепела был зарегистрирован основной фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} . Входящая и выходящая компоненты I_{K1} в желудочковых клетках превышали таковые в предсердных, различия в степени выпрямления тока не были выявлены. Карбахол вызывал активацию ацетилхолинзависимого тока входящего выпрямления I_{KACH} в предсердных, но не в желудочковых миоцитах. Ток I_{KACH} в предсердных миоцитах был чувствителен к терциапину. Конститутивно активный ацетилхолинзависимый ток I_{KACH} не был обнаружен ни в предсердных, ни в желудочковых клетках. В многоклеточных препаратах правого предсердия перепела карбахол вызывал гиперполяризацию и укорочение потенциалов действия, тогда как в препаратах правого желудочка эти эффекты отсутствовали. Активация тока I_{KACH} под действием карбахола была дозозависимой с $EC_{50}=4,922 \times 10^{-7}$ М. Описанное распределение токов входящего выпрямления I_{K1} и I_{KACH} в миокарде птиц сходно с таковым у млекопитающих, используемых в качестве экспериментальных объектов в физиологических исследованиях.

Ключевые слова: птицы, рабочий миокард, биоэлектрическая активность, изолированные кардиомиоциты, пэтч-кламп, ионные токи

Птицы наряду с млекопитающими в ходе эволюции независимо приобрели гомойотермность и четырехкамерное сердце, необходимое для адекватного снабжения тканей организма кислородом и поддержания оптимальной интенсивности метаболизма. При этом по своей морфологии и ультраструктуре кардиомиоциты птиц сходны с кардиомиоцитами рептилий. По сравнению с кардиомиоцитами млекопитающих, кардиомиоциты птиц имеют вытянутую, веретеновидную форму; в миоцитах птиц отсутствуют характерные для млекопитающих поперечные (или Т-) трубочки, необходимые для быстрой передачи возбуждения внутрь кардиомиоцита [1]. Несмотря на эти признаки, считаемые архаичными, сердца птиц способны поддерживать высокое системное давление в русле большого круга кровообращения и по производительности могут превосходить

сердца млекопитающих [2]. Поскольку сократительная активность и, следовательно, насосная функция сердца напрямую зависят от его электрической активности, предыдущие исследования нашей группы были нацелены на исследование набора ионных токов, обеспечивающих электрическую активность сердца птиц [3, 4]. Показано, что деполяризация миокарда птиц среднего размера (на примере японского перепела, *Coturnix japonica*) обеспечивается быстрым натриевым током I_{Na} [5] и кальциевым током L-типа I_{CaL} [4], в то время как реполяризацию обеспечивают транзитный выходящий калиевый ток I_{to1} , а также быстрый и медленный токи задержанного выпрямления, I_{Kr} и I_{Ks} [3]. Описываемый электрофизиологический фенотип отличается от набора токов в миокарде эволюционно наиболее близкой к птицам группы, рептилий [6], и в зна-

чительной степени напоминает электрофизиологический фенотип миокарда млекопитающих — в частности, человека [7, 8]. В совокупности это делает миокард птиц как перспективным объектом для фундаментальных исследований, так и потенциальным модельным объектом для испытаний новых кардиотропных препаратов, что требует более пристального изучения различных аспектов физиологии сердца птиц.

Семейство калиевых токов входящего выпрямления (I_{Kir}) является одной из наиболее важных групп токов в миокарде позвоночных животных и включает три тока: основной фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} , ацетилхолинзависимый ток I_{KACH} , а также АТФ-зависимый ток I_{KATP} , активирующийся только в условиях ишемии [9] и не рассматриваемый в настоящем исследовании. Основной функцией токов входящего выпрямления является поддержание стабильного негативного потенциала покоя и участие в поздней реполяризации кардиомиоцитов; фоновый ток I_{K1} выполняет эту функцию постоянно, тогда как ацетилхолинзависимый ток I_{KACH} активируется только при связывании ацетилхолина с М2-рецепторами и обеспечивает отрицательные хроно- и инотропный эффекты при возбуждении парасимпатической системы [10]. Целью данного исследования было выявление калиевых токов входящего выпрямления I_{K1} и I_{KACH} в рабочем миокарде птиц и описание их основных свойств, таких как вольт-амперные характеристики, чувствительность к блокаторам и агонистам, а также распределение каналов в миокарде.

Материалы и методы

Перепелы японские (*Coturnix japonica*, эстонская разновидность) обоих полов в возрасте 2–4 мес. и весом 250–300 г были получены с фермы «Орловский дворик» (г. Мытищи, Московская обл., Россия). Перед экспериментами животных содержали в течение 10 сут при световом дне 12:12 с доступом *ad libitum* к воде и промышленному корму для перепелов. Все процедуры проводили в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению с лабораторными животными.

Изолированные желудочковые и предсердные миоциты перепела выделяли по описанной ранее методике [4]. Животным вводили гепарин внутривенно (1000 ед./кг), после чего декапитировали. После вскрытия грудобрюшной полости сердце быстро вырезали и помещали на аппарат Лангендорфа для ретроградной перфузии не содержащим Ca^{2+} модифицированным физиологическим раствором следующего состава (мМ): NaCl — 116; KCl — 4; NaH_2PO_4 — 1,7; $NaHCO_3$ — 25; $MgCl_2$ — 0,55; пируват натрия — 5; таурин — 20; глюкоза — 11; бычий сывороточный альбумин — 1 мг/мл; pH поддерживали на уровне 7,4 аэрацией

карбогеном (95% O_2 ; 5% CO_2) при температуре 42°C. После вымывания крови из сердца и 7–9-минутной перфузии сердце перфузировали раствором аналогичного состава с добавлением коллагеназы II (0,4 мг/мл) и $CaCl_2$ (16 мМ). Перфузию раствором, содержащим фермент, проводили в течение 35 или 40 мин для выделения предсердных или желудочковых кардиомиоцитов соответственно. Изолированные кардиомиоциты в течение 6–8 ч хранили при температуре 24°C в растворе Kraftbrühe следующего состава (мМ): $MgSO_4$ — 3; KCl — 30; KH_2PO_4 — 30; EGTA — 0,5; глутамат калия — 50; Hepes — 20; таурин — 20; глюкоза — 10 (pH 7,2) [11].

Ионные токи, а также потенциалы действия в части экспериментов регистрировали в изолированных кардиомиоцитах перепела методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell с помощью усилителя НЕКА EPC-800 (НЕКА Elektronik, Германия). При записи ионных токов и потенциалов действия использовали, соответственно, режим фиксации потенциала (voltage clamp) или фиксации тока (current clamp). Клетки помещали в экспериментальную камеру RC-26 объемом 150 мкл (Warner Instrument Corporation, США) и постоянно перфузировали раствором, имитирующим внеклеточную среду (в мМ: NaCl — 150; KCl — 5,4; $CaCl_2$ — 1,8; $MgCl_2$ — 1,2; глюкоза — 10; Hepes — 10; pH 7,4), при температуре 24°C. Для блокирования кальциевого тока и медленного калиевого тока задержанного выпрямления в раствор добавляли нифедипин (10^{-5} М) и хроманол 293В ($2 \cdot 10^{-5}$ М) [3]. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instruments, США) и заполняли раствором (pH 7,2) следующего состава (мМ): KCl — 140; $MgCl_2$ — 1; ЭГТА — 5; Mg-АТФ — 4; Na_2 -ГТФ — 0,03; Hepes — 10. Сопротивление заполненных пэтч-пипеток составляло $2,72 \pm 0,47$ МΩ. Протокол изменения мембранного потенциала показан на врезках рисунков.

Амплитуду тока входящего выпрямления I_{K1} оценивали после вычитания тока, зарегистрированного в присутствии блокатора (1 мМ $BaCl_2$), что позволяло исключить ток утечки. Амплитуду ацетилхолинзависимого тока I_{KACH} оценивали как разность суммарного тока входящего выпрямления в присутствии агониста ацетилхолиновых рецепторов (ацетилхолин или карбахол, 10^{-6} М) и в контроле; также ток I_{KACH} идентифицировали по чувствительности к его селективному блокатору терциапину (10^{-6} М). Токи нормировали по емкости клетки. Степень выпрямления тока I_{K1} оценивали как отношение зарегистрированного в эксперименте тока I_{K1} к гипотетическому току, не подверженному выпрямлению (см. врезку на рис. 1). Зависимость данного соотношения от мембранного потенциала выражалась функцией Больцмана:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V - V_{0.5}}{k}}},$$

где V — поддерживаемый мембранный потенциал, $V_{0.5}$ — потенциал 50% выпрямления, k — наклон кривой.

Потенциалы действия регистрировали в изолированных многоклеточных препаратах желудочкового и предсердного миокарда перепела, используя стандартную микроэлектродную технику. Животных декапитировали, сердце извлекали и ретроградно промывали раствором Тироде (мМ): NaCl — 118; KCl — 2,7; MgCl₂ — 1,2; CaCl₂ — 1,8; NaHCO₃ — 25; глюкоза — 11; pH поддерживали на уровне 7,4 аэрацией карбогеном. В экспериментах были использованы препараты правого предсердия и правого желудочка японского перепела. Препараты миокарда помещали в экспериментальную камеру эндокардиальной стороной вверх и перфузировали раствором Тироде при температуре 42°C. Препараты электрически стимулировали с частотой 6 Гц, что соответствует частоте сердечных сокращений интактных животных [12]. Потенциалы действия регистрировали после периода адаптации препарата (30 мин) с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 3М раствором KCl (сопротивление электродов 20–50 МΩ) и подключенных к усилителю Model 1600 (A-M Systems, США). Длительность потенциалов действия оценивали на уровне 50% (ДПД50) и 90% (ДПД90) реполяризации.

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего от n клеток или препаратов миокарда. Статистическую обработку данных производили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). В зависимости от эксперимента, для оценки статистической значимости различий использовали t-тест Стьюдента для связанных или

несвязанных выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изменении мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до -120 мВ (рис. 1, см. врезку) в присутствии нифедипина и хроманола в изолированных кардиомиоцитах перепела наблюдался не инактивирующийся со временем ток, характеризующийся выпрямлением входящей компоненты. Форма вольт-амперной характеристики и чувствительность тока к 1 мМ BaCl₂ позволили определить его как фоновый ток входящего выпрямления I_{K1} . В желудочковых миоцитах амплитуда как входящей, так и выходящей компоненты тока была статистически значимо выше амплитуды тока в предсердных клетках (рис. 1А, Б). Такое соотношение характерно для большинства позвоночных животных, в том числе для человека: амплитуда I_{K1} в предсердных и желудочковых миоцитах перепела близка к амплитуде I_{K1} в изолированных кардиомиоцитах человека [9, 13, 14]. Разница в амплитуде тока I_{K1} между предсердиями и желудочками обеспечивает более отрицательный потенциал покоя в желудочковом миокарде перепела [3]. Стоит отметить, что по сравнению с холоднокровными позвоночными амплитуда I_{K1} в миокарде перепела весьма велика [6, 13], что может быть механизмом противодействия возникновению аритмий при высокой частоте сердечных сокращений, характерных для птиц. Однако при сравнении с литературными данными касательно распределения тока I_{K1} в миокарде млекопитающих со сходной частотой сокращения сердца оказывается, что при сходной амплитуде I_{K1} в желудочковых клетках амплитуда I_{K1} в предсердиях перепела заметно ниже по сравнению с таковой у мыши и морской свинки [15, 16]. Можно предположить, что в предсердном миокарде перепела роль реполяризационного резерва берут на себя

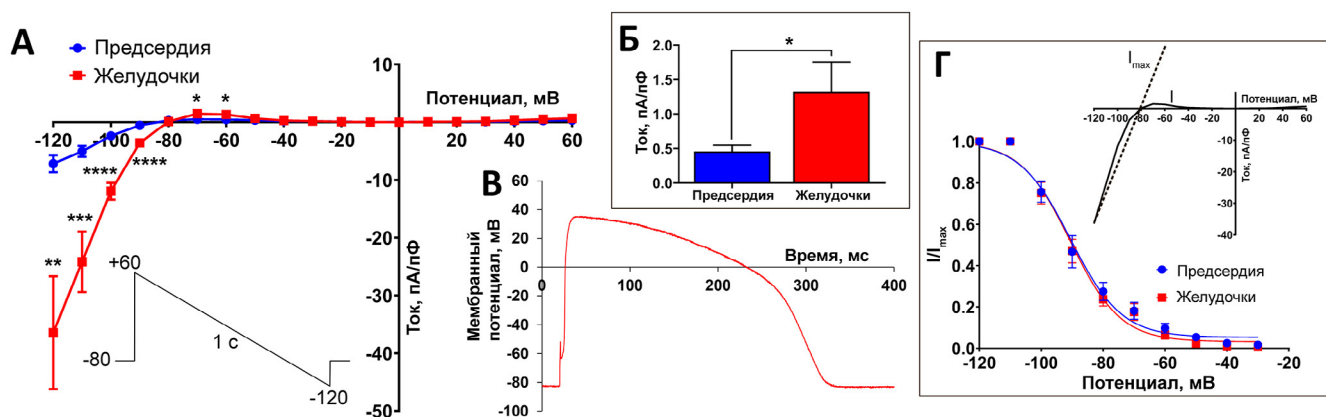


Рис. 1. Фоновый калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} в изолированных кардиомиоцитах перепела. А — вольт-амперные характеристики тока I_{K1} , зарегистрированного в предсердных ($n=9$) и желудочковых ($n=8$) кардиомиоцитах перепела. Б — средние амплитуды выходящей компоненты тока I_{K1} в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах перепела при потенциале +60 мВ. В — потенциал действия в изолированном желудочковом кардиомиоците перепела. Г — зависимость степени выпрямления тока I_{K1} в предсердных и желудочковых миоцитах перепела от поддерживаемого потенциала. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$; t-тест Стьюдента для несвязанных выборок.

другие токи — например, медленный ток задержанного выпрямления, имеющий большую амплитуду, но при этом слабо задействованный в норме. С другой стороны, более низкая по сравнению с таковой у грызунов амплитуда I_{K1} в предсердиях перепела может быть обусловлена филогенетически.

Большая амплитуда тока I_{K1} позволяла изолированным желудочковым кардиомиоцитам перепела поддерживать негативный мембранный потенциал в режиме current clamp, что, в свою очередь, делало возможным регистрацию потенциалов действия в отдельных миоцитах (рис. 1В). Однако в случае предсердных кардиомиоцитов из-за низкой амплитуды I_{K1} запись потенциалов действия методом пэтч-кламп была невозможной, поэтому в дальнейших экспериментах потенциалы действия регистрировали с использованием стандартной микроэлектродной техники.

Зависимость степени выпрямления тока I_{K1} от поддерживаемого потенциала не различалась между желудочковыми и предсердными кардиомиоцитами (рис. 1Г): потенциал 50% выпрямления $V_{0.5}$ в желудочковых клетках составил $-90,51$ мВ, а в предсердных — $-90,49$ мВ. Поскольку суммарный ток I_{K1} может быть опосредован несколькими изоформами каналов, характеризующимися разной степенью выпрямления тока [17], можно предполагать, что набор изоформ каналов данного семейства не различается между желудочковыми и предсердными кардиомиоцитами перепела — однако данное утверждение тре-

бует дальнейшей проверки с использованием молекулярно-биологических методов.

Карбахол (негидролизуемый аналог ацетилхолина) в концентрации 10^{-6} М вызывал увеличение как входящей, так и выходящей компоненты суммарного тока входящего выпрямления в предсердных (рис. 2А), но не в желудочковых (рис. 2Б) кардиомиоцитах перепела. Активируемый карбахолом в предсердных кардиомиоцитах ток был чувствителен к селективному блокатору тока $I_{K_{ACH}}$ терциапину (10^{-6} М), что позволяет идентифицировать его как $I_{K_{ACH}}$ [9]. В отсутствие каких-либо других внешних воздействий терциапин не индуцировал изменения суммарного тока входящего выпрямления как в предсердных, так и в желудочковых кардиомиоцитах, что свидетельствует об отсутствии конститутивно активного тока $I_{K_{ACH}}$. Карбахол вызывал гиперполяризацию и укорочение потенциалов действия (рис. 2В, Д, Е) в изолированных препаратах правого предсердия перепела, в то время как в препаратах желудочкового миокарда карбахол не вызывал аналогичных изменений в электрической активности (рис. 2Г).

Относительно высокая частота сокращений сердца птиц в сочетании с достаточно малой амплитудой быстрого тока задержанного выпрямления I_{Kr} [3] позволяет предположить, что в реполяризации миокарда перепела могут участвовать другие токи — например, конститутивно активный ток $I_{K_{ACH}}$. Это предположение не подтвердилось, однако, возможно, в миокарде птиц, как и в миокарде млекопитающих, конститутивно активный

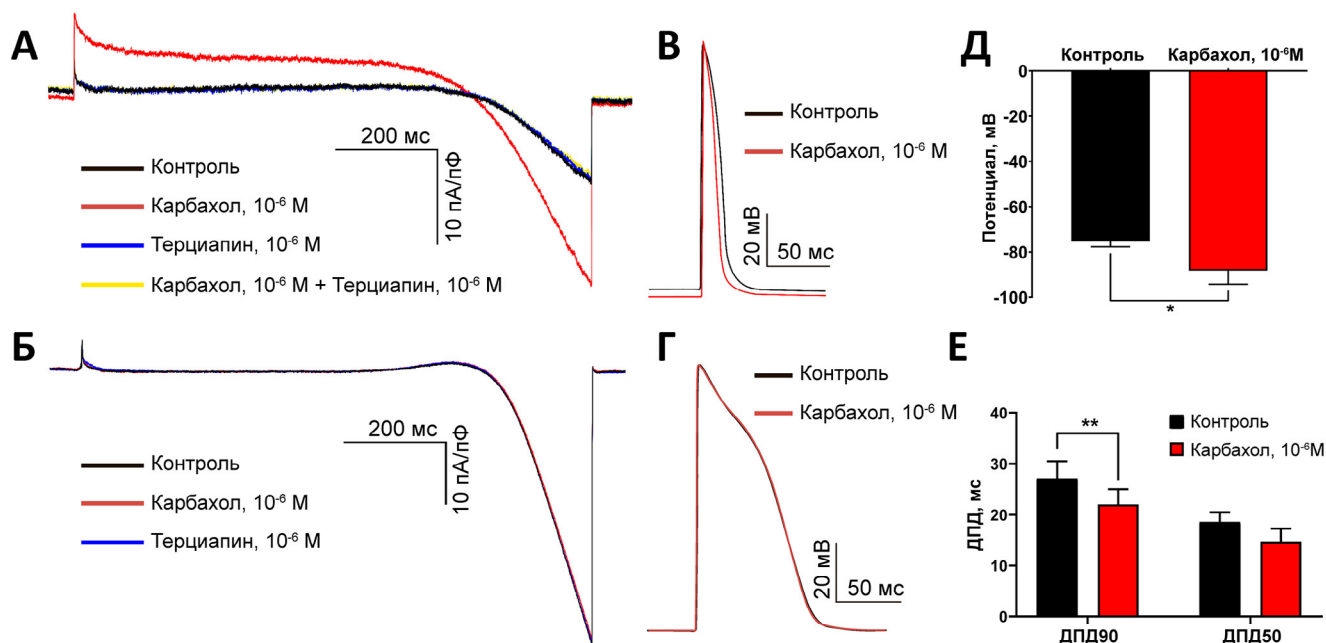


Рис. 2. Ацетилхолинзависимый ток $I_{K_{ACH}}$ в рабочем миокарде перепела: оригинальные записи суммарного тока входящего выпрямления в предсердных (А) и желудочковых (Б) миоцитах перепела в контрольных условиях, в присутствии агониста ацетилхолинзависимых рецепторов карбахола (10^{-6} М) и/или селективного блокатора тока $I_{K_{ACH}}$ терциапина (10^{-6} М); оригинальные записи потенциалов действия предсердного (В) и желудочкового (Г) миокарда в контрольных условиях и в присутствии 1 мкМ карбахола; мембранный потенциал покоя (Д) и длительность потенциалов действия (Е) в предсердном миокарде в контрольных условиях и в присутствии 10^{-6} М карбахола ($n = 6$). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; t-тест Стьюдента для связанных выборок

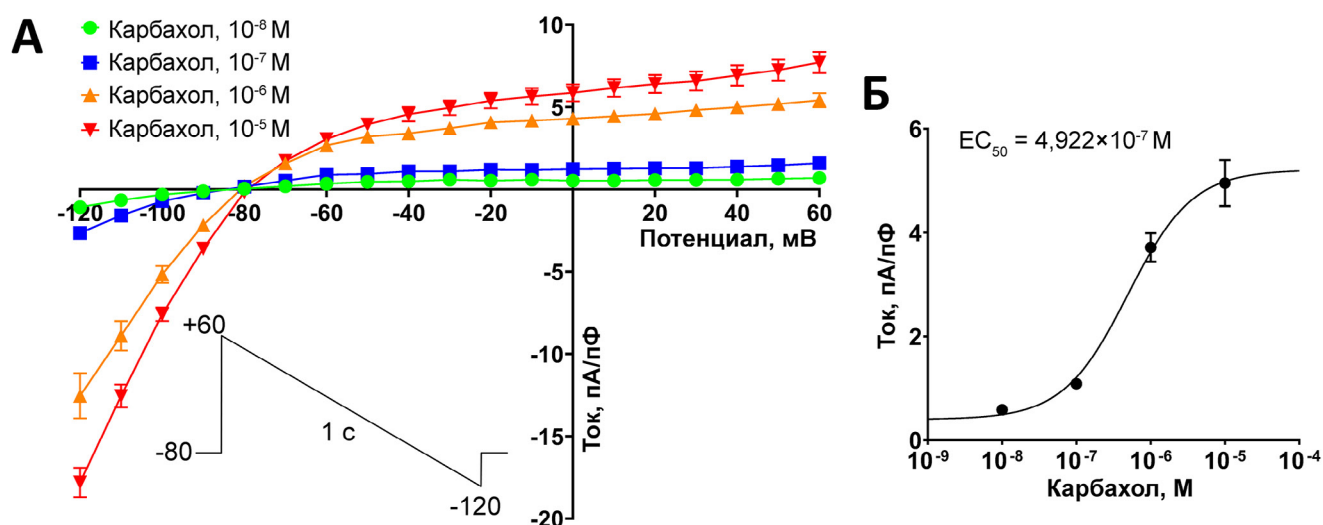


Рис. 3. Ацетилхолинзависимый ток I_{KACH} в предсердных кардиомиоцитах перепела. А — вольт-амперные характеристики тока I_{KACH} в присутствии карбахола в концентрациях 10^{-8} ($n = 6$), 10^{-7} ($n = 7$), 10^{-6} ($n = 8$) и 10^{-5} М ($n = 7$). Б — кривая дозозависимости тока I_{KACH} от концентрации карбахола при потенциале -30 мВ.

ток I_{KACH} может принимать участие в развитии патологических состояний — например, при фибрилляции предсердий [9]. Распределение каналов тока I_{KACH} в рабочем миокарде перепела — наличие их в предсердиях и отсутствие в желудочках — также характерно для большинства позвоночных животных [6, 9, 18]. Недавние исследования, однако, говорят о возможной минорной экспрессии каналов тока I_{KACH} в желудочковых кардиомиоцитах некоторых видов млекопитающих: каналы тока I_{KACH} были обнаружены в желудочковых кардиомиоцитах крыс и человека [19, 20]. Таким образом, нельзя исключить возможность обнаружения данных каналов в желудочковом миокарде птиц: I_{KACH} может быть замаскирован большим фоновым током I_{K1} в норме и активироваться только при условии подавления последнего, функционируя как механизм противодействия аритмиям [21]. Кроме того, нельзя исключить возможность гетерогенного распределения каналов I_{KACH} : так, в человеческом миокарде желудочков каналы I_{KACH} отсутствуют в срединном слое миокарда [20], а при выделении изолированных кардиомиоцитов основная масса клеток относится именно к этой популяции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shiels H.A., Galli G.L.J. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart // *Physiology*. 2014. Vol. 29. N 6. P. 456–469.
2. Jensen B., Wang T., Christoffels V.M., Moorman A.F.M. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2013. Vol. 1833. N 4. P. 783–794.
3. Filatova T.S., Abramochkin D. V., Pavlova N.S., Pustovit K.B., Konovalova O.P., Kuzmin V.S., Dobrzynski H. Repolarizing potassium currents in working myocardium of Japanese quail: Novel translational model for cardiac

Активация тока I_{KACH} в предсердных кардиомиоцитах перепела под действием карбахола была дозозависимой (рис. 3А). Концентрация полуингибирования EC_{50} составила $4,922 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 3Б). Это значение близко к значениям EC_{50} , полученным в исследованиях на других видах животных, включая млекопитающих, в том числе и человека [22, 23]. Амплитуда входящей и выходящей компоненты тока I_{KACH} в предсердных миоцитах также была сопоставима с данными, полученными в работах на других видах животных [23, 24].

Таким образом, распределение и характеристики основных токов входящего выпрямления в рабочем миокарде перепела близки к таковым у большинства позвоночных животных, в особенности — млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90142). Все эксперименты проводили в соответствии с директивой 86/609/ЕЕС по обращению с лабораторными животными. Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

electrophysiology // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2021. Vol. 255: 110919.

4. Filatova T.S., Abramochkin D. V., Shiels H.A. Warmer, faster, stronger: Ca^{2+} cycling in avian myocardium // *J. Exp. Biol.* 2020. Vol. 223. N 19: jeb228205.

5. Vornanen M., Hassinen M., Haverinen J. Tetrodotoxin sensitivity of the vertebrate cardiac Na^{+} current // *Mar. Drugs*. 2011. Vol. 9. N 11. P. 2409–2422.

6. Abramochkin D. V., Matchkov V., Wang T. A characterization of the electrophysiological properties of

the cardiomyocytes from ventricle, atrium and sinus venosus of the snake heart // J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 2020. Vol. 190. N 1. P. 63–73.

7. Cavero I., Crumb W. Native and cloned ion channels from human heart: laboratory models for evaluating the cardiac safety of new drugs // Eur. Hear. J. Suppl. 2001. Vol. 3. Suppl. K. P. K53–K63.

8. Jost N., Virág L., Bitay M., Takács J., Lengyel C., Biliczki P., Nagy Z., Bogáts G., Lathrop D.A., Papp J.G., Varró A. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: A vital role for I_{Ks} in human ventricular muscle // Circulation. 2005. Vol. 112. N 10. P. 1392–1399.

9. Ehrlich J.R. Inward rectifier potassium currents as a target for atrial fibrillation therapy // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2008. Vol. 52. N 2. P. 129–135.

10. Klein M.G., Shou M., Stohlman J., Solhjoo S., Haigney M., Tidwell R.R., Goldstein R.E., Flagg T.P., Haigney M.C. Role of suppression of the inward rectifier current in terminal action potential repolarization in the failing heart // Heart Rhythm. 2017. Vol. 14. N 8. P. 1217–1223.

11. Isenberg G., Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB medium” // Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 1982. Vol. 395. N 1. P. 6–18.

12. Valance D., Després G., Richard S., Constantin P., Mignon-Grasteau S., Leman S., Boissy A., Faure J.M., Leterrier C. Changes in heart rate variability during a tonic immobility test in quail // Physiol. Behav. 2008. Vol. 93. N 3. P. 512–520.

13. Haverinen J., Vornanen M. Responses of action potential and K^+ currents to temperature acclimation in fish hearts: phylogeny or thermal preferences? // Physiol. Biochem. Zool. 2009. Vol. 82. N 5. P. 468–482.

14. Varro A., Nanasi P.P., Lathrop D.A. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes // Acta Physiol. Scand. 1993. Vol. 149. N 2. P. 133–142.

15. Panama B.K., McLerie M., Lopatin A.N. Heterogeneity of I_{K1} in the mouse heart // Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol. 2007. Vol. 293. N 6. P. H3558–H3567.

16. Ward C.A., Ma Z., Lee S.S., Giles W.R. Potassium currents in atrial and ventricular myocytes from a rat model of cirrhosis // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1997. Vol. 273. N 2. P. G537–G544.

17. Hassinen M., Haverinen J., Hardy M.E., Shields H.A., Vornanen M. Inward rectifier potassium current (I_{K1}) and Kir2

composition of the zebrafish (*Danio rerio*) heart // Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 2015. Vol. 467. N 12. P. 2437–2446.

18. Skarsfeldt M.A., Bomholtz S.H., Lundegaard P.R., Lopez-Izquierdo A., Tristani-Firouzi M., Bentzen B.H. Atrial-specific ion channels in the zebrafish—A role of I_{KACH} in atrial repolarization // Acta Physiol. 2018. Vol. 223. N 3: e13049.

19. Dobrzynski H., Marples D.D.R., Musa H., Yamanushi T.T., Henderson Z., Takagishi Y., Honjo H., Kodama I., Boyett M.R. Distribution of the muscarinic K^+ channel proteins Kir3.1 and Kir3.4 in the ventricle, atrium, and sinoatrial node of heart // J. Histochem. Cytochem. 2001. Vol. 49. N 10. P. 1221–1234.

20. Liang B., Nissen J.D., Laursen M., Wang X., Skibsbjerg L., Hearing M.C., Andersen M.N., Rasmussen H.B., Wickman K., Grunnet M., Olesen S.-P., Jespersen T. G-protein-coupled inward rectifier potassium current contributes to ventricular repolarization // Cardiovasc. Res. 2014. Vol. 101. N 1. P. 175–184.

21. Beckmann C., Rinne A., Littwitz C., Mintert E., Bosche L.I., Kienitz M.-C., Pott L., Bender K. G Protein-Activated (GIRK) Current in Rat Ventricular Myocytes is Masked by Constitutive Inward Rectifier Current (I_{K1}) // Cell. Physiol. Biochem. 2008. Vol. 21. N 4. P. 259–268.

22. Dobrev D., Graf E., Wettwer E., Himmel H.M., Hála O., Doerfel C., Christ T., Schüler S., Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K^+ current (I_{KACH}) in chronic human atrial fibrillation decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I_{KACH} and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials // Circulation. 2001. Vol. 104. N 21. P. 2551–2557.

23. Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal changes of cholinergic response in the atrium of Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*) // J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol. 2017. Vol. 187. N 2. P. 329–338.

24. Lomax A.E., Rose R.A., Giles W.R. Electrophysiological evidence for a gradient of G protein-gated K^+ current in adult mouse atria // Br. J. Pharmacol. 2003. Vol. 140. N 3. P. 576–584.

Поступила в редакцию 20.03.2021 г.

После доработки 22.04.2021 г.

Принята в печать 26.04.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Inward rectifier currents I_{K1} and I_{KACH} in working myocardium of Japanese quail (*Coturnix japonica*)

T.S. Filatova^{1,2,3,*} , D.V. Abramochkin^{1,2,3} 

¹Department of Human and Animal Physiology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Laboratory of Cardiac Electrophysiology, National Medical Research Center for Cardiology,

³Cherepkovskaya str., 15A, Moscow, Russia;

³Department of Physiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova str., 1, Moscow, Russia

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

Birds acquired endothermy and four-chambered heart independently from mammals in the course of evolution. Though avian embryos are widely used in experiments, little is known about adult avian heart. Recent studies have shown that despite of big evolutionary distance, the set of

repolarizing potassium currents in avian myocardium resembles that in mammalian heart as well as in humans. That allows to propose birds as a potential model in experimental cardiology. The present study for the first time describes inward rectifier potassium currents in working myocardium of quail. Using patch clamp method, we recorded main background inward rectifier current I_{K1} in isolated atrial and ventricular cardiomyocytes of quail. Both inward and outward components of I_{K1} in ventricular cells were larger than those in atrial cells, while there were no differences in voltage dependence of inward rectification. Acetylcholine and carbachol induced activation of acetylcholine-dependent inward rectifier current I_{KACH} in atrial, but not in ventricular myocytes. I_{KACH} in atrial myocytes was sensitive to tertiapin. Constitutively active I_{KACH} has not been detected. In multicellular preparations of quail right atrium carbachol induced hyperpolarization and shortening of action potentials, while in preparations of right ventricle no such effects were observed. Activation of I_{KACH} upon application of carbachol was dose-dependent with $EC_{50}=4,922 \cdot 10^{-7}$ M. The described distribution of inward rectifier currents in avian myocardium is similar to that in mammalian species, which are widely used as model objects in experimental cardiology.

Keywords: *birds, working myocardium, bioelectrical activity, isolated cardiomyocytes, patch clamp, ionic currents*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 19-34-90142.

Сведения об авторах

Филатова Татьяна Сергеевна — мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; лаборант-исследователь лаборатории электрофизиологии сердца Национального медицинского исследовательского центра кардиологии; мл. науч. сотр. кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-929-515-25-78; e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; зав. лабораторией электрофизиологии сердца Национального медицинского исследовательского центра кардиологии; профессор кафедры физиологии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-916-603-05-02; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Воздействие протеиназы *Aspergillus fumigatus* на белки плазмы кровиА.А. Осмоловский^{1,*} , Л. Шмидт², А.В. Орехова^{1,3}, В.Г. Крейер¹,
Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров⁴¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12;²Faculty of Science I, Halle-Wittenberg Martin Luther University, Germany, 06108, Halle, Universitätsplatz, 10;³Faculty of Pharmacology and Medicine, University of Rome "La Sapienza", Italy, 00185, Rome, Piazzale Aldo Moro, 5;⁴Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Выделена внеклеточная протеиназа условно-патогенного штамма *Aspergillus fumigatus* D-1 (молекулярная масса ~33 кДа, pI 4,6). Показано, что протеиназа в разной степени гидролизует казеин, фибрин, фибриноген, альбумин и гемоглобин. Однако протеолитическая активность по отношению к глобулярным белкам плазмы крови оказалась сопоставимой с фибринолитической. Протеиназа не коагулировала фибриноген человека, фибриноген быка, а также не свертывала плазму крови человека и кролика без разведения и разведенную в два раза. Была обнаружена активаторная к плазминогену активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1, что может указывать на ее способность к непрямому фибринолизу.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, ферментные препараты, *Aspergillus fumigatus*, тромболитизис, изoeлектрофокусирование

Мицелиальный гриб *Aspergillus fumigatus* – условный патоген, широко распространенный в природе, его изоляты выделяются из различных экотопов, от органического компоста до тканей различных органов человека [1–5]. Известны мезофильные и термотолерантные штаммы этого микромицета, протеолитически активные в отношении таких белковых субстратов, как казеин, желатин, фибриноген, фибрин [2, 3, 6]. Считается, что протеиназы *A. fumigatus* выступают в качестве факторов патогенности, усиливая его проникновение в ткани хозяина, а геномный и протеомный анализ выявляют большое количество секретируемых протеиназ, обеспечивающих его чрезвычайную адаптивность во время заражения на основе обширной избыточности генов [7].

Геном *A. fumigatus* кодирует более 100 секретируемых протеиназ, из которых к настоящему времени охарактеризовано менее 15 [8]. Наиболее хорошо изучены свойства металлопротеазы и сериновой протеиназы *A. fumigatus*. Секретция обеих носит индуцибельный характер, что обуславливает их способность гидролизовать при патогенезе различные белки, доступные им в качестве субстратов в организме хозяина [2, 9]. Описанная щелочная сериновая протеиназа Alp1 секретируется преимущественно при прорастании спор *A. fumigatus* в легочной ткани и представляет собой белок с молекулярной массой около 33 кДа, рас-

щепляющий широкий круг белковых субстратов [2, 10]. С секретией именно этой протеиназы связывают различные физиологические реакции на проникновения грибковой инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом [11].

Среди вызываемых посредством протеолитической активности *A. fumigatus* заболеваний – тяжелая астма с грибковой сенсibilизацией, аллергический бронхолегочный аспергиллез [9] и гиперчувствительность дыхательных путей [12]. Показано, что *A. fumigatus* нарушает барьер альвеолярных эпителиальных клеток, секретируя протеиназы, которые действуют вместе, дезорганизуя актиновый цитоскелет и разрушая клетки [5], а также расщепляя белки C3, C4, C5, C1q системы комплемента и иммуноглобулин G [13, 14], уклоняясь таким образом от атаки комплемента хозяина.

Секретция протеиназ *A. fumigatus* в лабораторных условиях, как и секретия других ферментов, зависит от условий культивирования и состава питательной среды. В частности, было показано, что оба типа протеиназ микромицета, сериновые и металлопротеиназы, продуцируются в условиях глубинного культивирования, в то время как в условиях твердофазного культивирования выявлена секретия только сериновых протеиназ [15].

Согласно последним данным, протеиназы *A. fumigatus* могут выступать потенциальными диагностическими биомаркерами при грибном пато-

генезе и, соответственно, рассматриваться как новые мишени для терапии грибковой астмы [11]. В связи с этим актуальным становится расширение представлений о специфичности протеиназы данного микромицета *in vitro* и *in vivo* среди различных белков тканей внутренней среды организма человека.

Целью работы было выделение секретируемой протеиназы *A. fumigatus* D-1 и изучение ее воздействия на белки плазменного гемостаза человека.

Материалы и методы

Получение и фракционирование препарата внеклеточной протеиназы микромицета *A. fumigatus* D-1. Штамм микромицета выращивали в течение 7 сут в пробирке на скошенном сусло-агаре, после чего споры смывали стерильным физиологическим раствором в качалочную колбу объемом 750 мл со 100 мл среды, содержащей сусло, глюкозу и пептон [16]. Культивирование проводили 2 сут при 28°C и скорости вращения платформы 200 об./мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 («BioSan», Латвия). После этого часть полученного посевного материала переносили в качалочные колбы со средой следующего состава (в %): глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05, pH 5,5–6,0 и продолжали культивирование в тех же условиях. По истечении 5 сут культуральную жидкость отделяли от биомассы микромицета фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия) и осаждали из нее внеклеточные белки сульфатом аммония (степень насыщения 0,8). Осадок, содержащий протеазы микромицета, отделяли центрифугированием при 4°C и 15000 g в течение 15 мин на центрифуге Beckman J2-21 («Beckman», Германия). Полученный осадок перерастворяли в 0,001 М Трис-НСl буфере, pH 8,2 и диализовали в диализном мешочке против этого же буфера в течение 12 ч при 4°C, после чего диализат повторно центрифугировали. Для фракционирования выделенных белков супернатант наносили на препаративную колонку для изоэлектрофокусирования (объем 110 мл, «ЛКВ», Швеция). Изоэлектрофокусирование проводили в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга (800 В, 4°C, 36 ч) [17], используя амфолины фирмы ЛКВ (Швеция) с pH 2,5–10. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1,5 мл с помощью коллектора фракций («ЛКВ», Швеция), в которых определяли белок (поглощение при 280 нм), pH и протеолитическую активность. Фракции с наибольшей протеолитической активностью замораживали и использовали для дальнейших исследований.

Электрофоретический анализ выделенной протеиназы *A. fumigatus* D-1. Для подтверждения гомогенности выделенной протеиназы проводили

электрофорез по Лэммли в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) [18]. Для окраски гелей использовали 0,25%-ный раствор Кумасси (бриллиантового голубого) R-250 в 46%-ном этаноле и 10%-ной уксусной кислоте. Молекулярную массу протеиназы определяли в присутствии маркеров Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo Scientific», США).

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ определяли с помощью 1%-ных суспензий казеина по Хаммерштейну («Sigma-Aldrich», США), бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich», США) и гемоглобина лошади («Reanal», Венгрия) по модифицированному методу Ансона-Хагихары [19]. Для реакций брали по 200 мкл пробы и 400 мкл суспензии соответствующего белкового субстрата, приготовленного на 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 8,2), инкубировали 10 мин при 37°C при постоянном встряхивании (600 об./мин). Реакцию останавливали 600 мкл 10%-ной трихлоруксусной кислоты, после чего образцы центрифугировали (12400 g, 10 мин) и измеряли поглощение при 275 нм в супернатанте. Активность выражали в мкмольях тирозина, образовавшегося за 1 мин в 1 мл пробы ($E_{\text{тир}}$).

Плазминоподобную активность (на прогретых фибриновых пластинах) и активность активаторов плазминогена (на непрогретых фибриновых пластинах) определяли по модифицированному методу Аструпа–Мюллертца–Лансена и выражали в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости [20, 21]. Инкубацию фибриновых пластинок с нанесенными образцами фильтрата культуральной жидкости микромицетов проводили в течение 3 ч. Активность выражали в усл. ед./мл.

Изучение коагулирующего действия протеиназы *A. fumigatus* D-1. Способность выделенной протеиназы коагулировать белки плазмы крови определяли по свертыванию 0,4%-ных растворов человеческого и бычьего фибриногена («Sigma-Aldrich», США) и не разведенных или разведенных в 2 раза плазм человека и кролика («Ренам», Россия). В обоих случаях к 200 мкл раствора субстрата добавляли 100 мкл пробы и инкубировали в статических условиях 10 мин при 37°C. 0,1%-ный раствор тромбина («Sigma-Aldrich», США) использовали в качестве положительного контроля.

Тромболизис *in vitro*. Тромболитическую активность протеиназы измеряли гравиметрически, как описано Котбом с соавт. [4, 21]. Для приготовления тромбов в предварительно взвешенных пробирках «Эппендорф» смешивали 200 мкл плазмы человека («Ренам», Россия) и 20 мкл 0,1%-ного раствора тромбина («Sigma-Aldrich», США), выдерживали 30 мин при 37°C, после чего их повторно взвешивали с полученными тромбами. Затем к тромбам добавляли 250 мкл пробы и инкубировали при перемешивании (250 об./мин) при 37°C

в течение 30, 60, 90, 120 и 180 мин. По окончании инкубирования лизат удаляли с помощью фильтровальной бумаги и еще раз взвешивали пробирки, после чего рассчитывали процент негидролизованых тромбов.

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд, для чего к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Кумасси (бриллиантового голубого) G-250 и регистрировали светопоглощение при 595 нм [22].

Расчет выраженности действия протеиназы. Для оценки эффективности действия выделенной протеиназы по отношению к фибрину и к фибриногену рассчитывали соотношения $\Phi A/KA$ и $\Phi A/\Phi GA$, где ΦA – фибринолитическая активность, KA – казеинолитическая активность, ΦGA – фибриногенолитическая активность [23–26].

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic («Eppendorf», Германия).

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выделение внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1 осуществляли путем высаливания внеклеточных белков сульфатом аммония из культуральной жидкости микромицета с их последующим диализом и разделением с помощью препаративного колоночного изоэлектрофокусирования. Результаты разделения внеклеточных белков методом изоэлектрофокусирования пред-

ставлены на рис. 1, из которого видно, что удалось выделить несколько протеолитически активных фракций в диапазоне pI от 4,5 до 5,7 с максимальной активностью при pI 4,6. Электрофорез по Лэммли в присутствии SDS показал содержание во фракции одного полипептида с молекулярной массой около 33 кДа (рис. 2).

Воздействие выделенной протеиназы микромицета на систему гемостаза изучали по двум типам реакций: свертывающим и протеолитическим.

В качестве субстратов для коагулирования использовали плазму крови и раствор фибриногена. Свертывание обоих субстратов должно приводить к образованию визуализируемого тромба. Как видно из табл. 1, протеиназа *A. fumigatus* D-1 не обладала способностью коагулировать ни фибриноген человека, ни фибриноген быка. Аналогичный результат был получен при изучении коагулирования протеиназой плазмы крови кролика и плазмы крови человека, в том числе при их разведении в два раза. Известно, что протеиназы микромицетов различаются по способности оказывать свертывающее воздействие на плазму [27]. Так, например, протеиназа *A. ochraceus* L-1 коагулирует плазму человека вследствие активации фактора X системы гемостаза человека [28].

Таблица 1

Коагулирующее действие протеиназы *A. fumigatus* D-1

Субстрат	Фибриноген человека	Фибриноген быка	Плазма человека 1:1	Плазма человека 1:2	Плазма кролика 1:1	Плазма кролика 1:2
Протеиназа						
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-
Тромбин	+	+	+	+	+	+

В табл. 2 представлены данные по активности протеиназы *A. fumigatus* D-1 в отношении различных белковых субстратов. Выделенная протеиназа

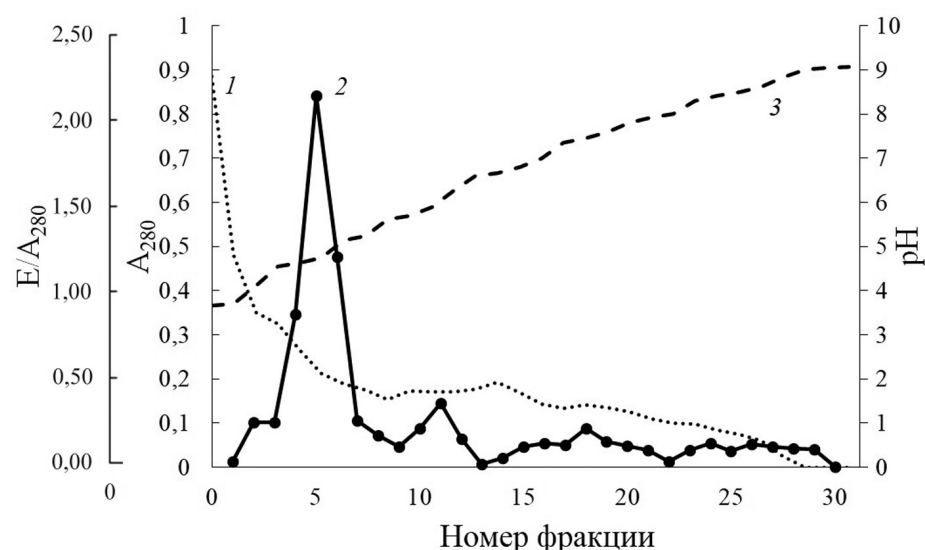


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. fumigatus* D-1: 1 – белок, A_{280} ; 2 – протеолитическая активность; 3 – pH.

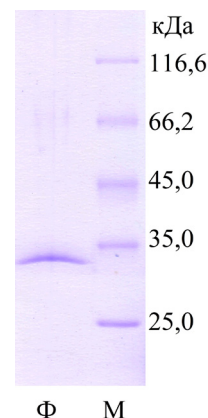


Рис. 2. Электрофорез в SDS-ПААГ протеиназы *A. fumigatus* D-1: Ф – протеолитически активная фракция, М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: β -галактозидаза, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, лактатдегидрогеназа, эндонуклеаза рестрикции Bsp981).

в разной степени гидролизovala казеин, фибрин, фибриноген, альбумин и гемоглобин. Наиболее активный протеолиз среди изученных субстратов был выявлен по отношению к казеину (1363,5 Е_{Тур}/мг белка). Казеинолитическая активность превышала в 4,5–13 раз активность по отношению к другим белковым субстратам (табл. 2). Выделенная протеиназа также была способна эффективно гидролизовать гемоглобин и в меньшей степени фибрин и фибриноген. Фибринолитическая активность протеиназы оказалась сопоставимой с ее альбуминолитической активностью. Показатель выраженности действия протеиназы по отношению к фибрину (соотношение ФА/КА) составил 0,13, а к фибриногену (соотношение ФА/ФгА) – 1,78. Из полученных данных следует, что протеиназа *A. fumigatus* D-1 обладает сродством к фибрину. Для протеиназы другого микромицета – *A. ochraceus* L-1 – соотношение ФА/ФгА превышает соотношение ФА/КА лишь в 2 раза, что может указывать на ее бoльшую специфичность к фибриногену, чем к фибрину [26]. Следует отметить, что непатогенный микромицет *A. ochraceus* L-1 по сравнению с условно патогенным *A. fumigatus* D-1 обладает меньшей казеинолитической активностью. Это подтверждает немногочисленные данные о различии в спектре гидролизуемых белковых субстратов и специфичности протеолитических ферментов микромицетов из разных эколого-трофических групп [29].

Таблица 2

Протеолитическая активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1

Активность	Единицы измерения	Значение активности
Казеинолитическая	Е _{Тур} /мг	1363,5
Фибринолитическая	Е _{Тур} /мг	183,4
Фибриногенолитическая	Е _{Тур} /мг	102,7
Альбуминолитическая (бычий сывороточный альбумин)	Е _{Тур} /мг	201,9
Гемоглобинолитическая	Е _{Тур} /мг	301,6
Фибринолитическая (фибриновые пластины)	Усл.ед./мг	628,4
Активаторная к плазминогену (фибриновые пластины)	Усл.ед./мг	862,7

Также была обнаружена активаторная к плазминогену активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1, что может указывать на ее способность к непрямому фибринолизу. Ее значение было в 1,4 раза выше фибринолитической активности. Фибринолитическая активность протеина-

зы микромицета в опытах на фибриновых пластинах была сопоставимой с этим показателем для других микромицетов – *A. niger* 29, *A. ochraceus* L-1, *A. versicolor* 1, *Beauveria bassiana* 2 [20].

Обладание сопоставимой протеолитической активностью к глобулярным и фибриллярным белкам плазмы крови протеиназой микромицета *A. fumigatus* D-1, включая способность активировать плазминоген, может свидетельствовать о ее роли в качестве фактора вирулентности и подтвердить участие грибных протеолитических ферментов в патогенезе [29].

На следующем этапе работы проводили оценку способности протеиназы к лизису новообразованных тромбов (рис. 3). Протеиназа *A. fumigatus* D-1 достаточно быстро растворяла тромбы: через 30 мин инкубации остаточная масса тромба составила 35%, через 90 мин – 14%. Полностью тромб был гидролизован за 180 мин. Высокая скорость лизиса тромбов свидетельствует о сродстве протеиназы *A. fumigatus* D-1 к фибрину.

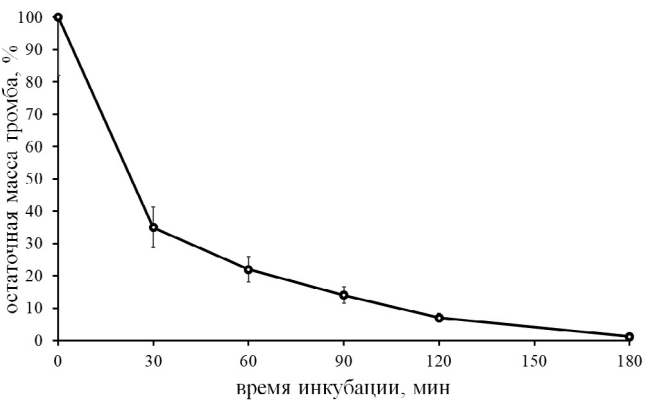


Рис. 3. Динамика тромболитического действия протеиназой *A. fumigatus* D-1.

Таким образом, была выделена в гомогенном виде новая секретируемая протеиназа условно патогенного штамма *A. fumigatus* D-1 и изучена ее протеолитическая активность в отношении различных белковых субстратов. Показано, что, помимо глобулярных белков, протеиназа может гидролизовать фибрин и, по-видимому, выступать в качестве фактора патогенности. Протеиназа не обладала фибриногенсвертывающей и плазмасвертывающей активностью.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jönsson A.G., Martin S.M. Protease production by *Aspergillus fumigatus* // Agric. Biol. Chem. 1964. Vol. 28. N 10. P. 734–739.
2. Abdel-Rahman T.M.A., Salama A.A.M., Ali M.I.A., Tharwat N.A.H. Fibrinolytic activity of some fungi isolated

from self-heated composted fertilizer // Bot. Mag. (Tokyo). 1990. Vol. 103. P. 313–324.
3. Oyeleke S.B., Egwim E.C., Auta S.H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production // J. Microbiol. Antimicrob. 2010. Vol. 2. N 7. P. 83–87.

4. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // *Biologia*. 2015. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
5. Kogan T.V., Jadoun J., Mittelman L., Hirschberg K., Osharov N. Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes // *J. Infect. Dis.* 2004. Vol. 189. N 11. P. 1965–1973.
6. Bouchara J.-P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G., Chabasse D. Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1993. Vol. 7. N 1. P. 81–91.
7. Shemesh E., Hanf B., Hagag S., Attias S., Shadkchan Y., Fichtman B., Harel A., Krüger T., Brakhage A.A., Knemeyer O., Osharov N. Phenotypic and proteomic analysis of the *Aspergillus fumigatus* ΔPrtT, ΔXprG and ΔXprG/ΔPrtT protease-deficient mutants // *Front Microbiol.* 2017. Vol. 12. N 8: 2490.
8. Watson D.S., Feng X., Askew D.S., Jambunathan K., Kodukula K., Galande A.K. Substrate specificity profiling of the *Aspergillus fumigatus* proteolytic secretome reveals consensus motifs with predominance of Ile/Leu and Phe/Tyr // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 6: e21001.
9. Farnell E., Rousseau K., Thornton D.J., Bowyer P., Herrick S.E. Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates // *Fungal Biol.* 2012. Vol. 116. N 9. P. 1003–1012.
10. Moutaouakil M., Monod M., Prévost M.C., Bouchara J.P., Paris S., Latgé J.P. Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* *in vitro* and *in vivo* // *J. Med. Microbiol.* 1993. Vol. 39. N 5. P. 393–399.
11. Druet K.M., McCullough M., Krishnan R. *Aspergillus fumigatus* protease alkaline protease 1 (Alp1): a new therapeutic target for fungal asthma // *J. Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6. N 2: 88.
12. Redes J.L., Basu T., Ram-Mohan S., Ghosh C.C., Chan E.C., Sek A.C., Zhao M., Krishnan R., Rosenberg H.F., Druet K.M. *Aspergillus fumigatus* – secreted alkaline protease 1 mediates airways hyperresponsiveness in severe asthma // *Immunohorizons*. 2019. Vol. 3. N 8. P. 368–377.
13. Behnsen J., Hartmann A., Schmalzer J., Gehrke A., Brakhage A.A., Zipfel P.F. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system // *Infect. Immun.* 2008. Vol. 76. N 2. P. 820–827.
14. Behnsen J., Lessing F., Schindler S., Wartenberg D., Jacobsen I.D., Thoen M., Zipfel P.F., Brakhage A.A. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5 // *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78. N 8. P. 3585–3594.
15. da Silva R.R., de Freitas Cabral T.P., Rodrigues A., Cabral H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* 2013. Vol. 44. N 1. P. 235–243.
16. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
17. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins // *Methods in Enzymology*, vol. 22. / Ed. W.B. Jakoby. Cambridge: Academic Press, 1971. P. 389–412.
18. Laemly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. N 6. P. 680–685.
19. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
20. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
21. Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* // *Applied Biochem. Microbiol.* 2021. Vol. 57. N 1. P. 429–434.
22. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.
23. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
24. Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I., Lee S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. Vol. 62. N 7. P. 2482–2488.
25. Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from Kishk, a traditional Egyptian fermented food // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. Vol. 51. N 1. P. 34–43.
26. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
27. Ключевская В.В., Егоров Н.С. О плазмокоагулирующей и фибринолитической активности грибов рода *Aspergillus* // *Микробиология*. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
28. Orekhova A.V., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility for application of extracellular protease of micromycete *Aspergillus ochraceus* for determining factor X content in human blood plasma // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 117–120.
29. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // *Mycopathologia*. 2011. Vol. 171. N 5. P. 299–323.

Поступила в редакцию 31.01.2021 г.

После доработки 21.03.2021 г.

Принята в печать 05.04.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Effect of *Aspergillus fumigatus* proteinases on blood plasma proteins

A.A. Osmolovskiy^{1,*} , L. Schmidt², A.V. Orekhova^{1,3}, V.G. Kreyer¹,
N.A. Baranova¹, N.S. Egorov⁴

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

²Faculty of Science I, Halle-Wittenberg Martin Luther University, Universitätsplatz 10, Halle, 06108, Germany;

³Faculty of Pharmacology and Medicine, University of Rome “La Sapienza”, Piazzale Aldo Moro 5, Rome, 00185, Italy;

⁴International Biotechnological Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

Extracellular proteinase of the opportunistic *Aspergillus fumigatus* D-1 strain (molecular weight ~ 33 kDa, pI 4.6) was isolated. It has been shown that proteinase hydrolyzes casein, fibrin, fibrinogen, albumin, and hemoglobin to varying degrees. However, proteolytic activity in relation to globular proteins of blood plasma was comparable to fibrinolytic activity. Proteinase did not coagulate human fibrinogen, bovine fibrinogen, and also did not coagulate human and rabbit blood plasma without dilution and twice diluted. A plasminogen activating activity of *A. fumigatus* D-1 extracellular proteinase was found, which may indicate its ability to indirect fibrinolysis.

Keywords: *proteinases of micromycetes, fibrinolytic activity, enzyme preparations, Aspergillus fumigatus, thrombolysis, isoelectric focusing*

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Шмидт Лаура (Laura Schmidt) — магистр университета Галле-Виттенберга. Тел.: 0345-55-25072; e-mail: laura-schmidt.96@gmx.de

Орехова Анастасия Владимировна — вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

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

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: baranovana2012@mail.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.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, ВИНТИ, 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, межстрочный 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;

²Chair 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 (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — 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., Борzych 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.