



Научная статья

05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов и функционального и специализированного назначения и общественного питания (технические науки)

УДК 637.03

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.023



ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ

Сергей Леонидович Тихонов¹, Наталья Валерьевна Тихонова²,
Ирина Георгиевна Данилова³, Анна Сергеевна Ожгихина⁴,
Мария Сергеевна Тихонова⁵, Анжелика Денисовна Поповских⁶

^{1, 2, 6} Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия

³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

⁴ Южно-Уральский государственный аграрный университет, Троицк, Россия,

⁵ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

¹ tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

² tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

³ ig-danilova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6841-1197>

⁴ annatebenkova92@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8031-9614>

⁵ tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4229-2174>

⁶ a.d.popovskih@usue.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3209-2205>

Аннотация. Несмотря на большие успехи, достигнутые в создании пищевой продукции для профилактики алиментарнозависимых заболеваний, некоторые проблемы сохранения здоровья человека остаются без ответа. Развитие онкологических заболеваний, бактериальных и вирусных инфекций со множественной лекарственной устойчивостью по-прежнему представляет собой угрозу мирового значения. Альтернативой известным лекарственным препаратам и микронутриентам представляются природные биологически активные пептиды, обладающие широким спектром антимикробной, противоопухолевой, и иммуностимулирующей активностями. Цель исследований – выделение, характеристика и оценка перспектив использования пептидов трипсинового и пепсинового гидролизата молозива коров в производстве пищевой продукции специализированного назначения и лекарственных препаратов. Белковые фракции ферментативного гидролизата молозива коров исследовали на масс-спектрометре МАЛДИ-ТОФ, расшифровку проводили с помощью базы данных Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) с использованием базы данных Protein NCBI. В трипсиновом гидролизате молозива коров выделено 7 пептидов, в пепсиновом гидролизате – 9 пептидов. Выделенные пептиды характеризуются различной аминокислотной последовательностью, молекулярной массой и скором, различаются по физиологическим функциям в организме человека. Пептид «Dualspecificityproteinphosphatase» способен активизировать иммунный ответ, «NCI_CGAP_Brn23 Клонк ДНК Homo sapiens» обеспечивает нормальное развитие центральной нервной системы, пептид «ВАМА» способен встраиваться во внешнюю мембрану бактерий, что позволяет его использовать как переносчик грузов в клетки организма для поддержания жизнедеятельности или борьбы с вирусными инфекциями, для подавления опухолевых клеток. Пептид «Nuclearreceptor 2C2-associatedprotein» препятствует возникновению рака. Функции других выделенных пептидов не изучены, что предполагает проведение исследований по оценке их биологической активности. Полученные данные позволяют предположить, что пептиды с доказанной фармакологической активностью после проведения дополнительных доклинических и клинических исследований можно использовать при разработке продуктов питания функциональной направленности и терапевтических средств широкого спектра действия.

Ключевые слова: пептиды, молозиво коров, ферменты, трипсин, пепсин, гидролизат, биологическая активность, пищевая продукция специализированного назначения, терапевтические средства.

Для цитирования: Выделение, характеристика и перспективы использования пептидов молозива коров / С. Л. Тихонов [и др.]. // Ползуновский вестник. 2022. № 4. Т. 1 С. 174–186. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.023. EDN: <https://elibrary.ru/AKJRCZ>.

Original article

SELECTION, CHARACTERISTICS AND PROSPECTS OF USING PEPTIDE OF COLOSTRUM OF COWS

Sergey L. Tikhonov¹, Natalya V. Tikhonova², Irina G. Danilova³,
Anna S. Ozhgihina⁴, Mariya S. Tikhonova⁵, Anzhelika D. Popovskih⁶

^{1, 2, 6} Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia

³ Institute of Immunology and Physiology, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia,

⁴ South Ural State Agrarian University, Troitsk, Russia,

⁵ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

¹ tikhonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

² tikhonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

³ ig-danilova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6841-1197>

⁴ annatebenkova92@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8031-9614>

⁵ tikhonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4229-2174>

⁶ a.d.popovskih@usue.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3209-2205>

Abstract. Despite the great successes achieved in the creation of food products for the prevention of alimentary-dependent diseases, some problems of preserving human health remain unanswered. The development of oncological diseases, bacterial and viral infections with multidrug resistance is still a threat of global importance. Natural biologically active peptides with a wide range of antimicrobial, antitumor, and immunostimulating activities are presented as an alternative to known medicinal preparations and micronutrients. The purpose of the research is to isolate, characterize and evaluate the prospects for the use of peptides of trypsin and pepsin hydrolysate of cow milk in the production of specialized food products and medicinal preparations. Protein fractions of enzymatic hydrolysate of cow colostrum were studied on a MALDI-TOPH mass spectrometer, decryption was carried out using the Mascot database, the Peptide Fingerprint option (Matrix Science, USA) using the Protein NCBI database. 7 peptides were isolated in trypsin hydrolysate of cow colostrum, 9 peptides were isolated in pepsin hydrolysate. The isolated peptides are characterized by different amino acid sequence, molecular weight, etc., and differ in physiological functions in the human body. The peptide "Dual specificity protein phosphatase" is able to activate the immune response, "NCI_CGAP_Brn23 Clone of Homo sapiens cDNA" ensures the normal development of the central nervous system, the peptide "BAMA" is able to integrate into the outer membrane of bacteria, which allows it to be used as a cargo carrier into the cells of the body to maintain vital activity or fight viral infections, to suppress tumor cells. The peptide "Nuclear receptor 2C2-associated protein" prevents the occurrence of cancer. The functions of other isolated peptides have not been studied, which suggests conducting studies to assess their biological activity. The data obtained suggest that peptides with proven pharmacological activity after additional preclinical and clinical studies can be used in the development of functional foods and therapeutic agents of a wide spectrum of action.

Keywords: peptides, cow colostrum, enzymes, trypsin, pepsin, hydrolysate, biological activity, specialized food products, therapeutic agents.

Acknowledgements: the author expresses gratitude to his / her colleagues for their help, thanks for the financial support of the research.

For citation: Tikhonov, S.L., Tikhonova, N.V., Danilova, I.G., Ozhgihina, A.S., Tikhonova, M.S. & Popovskih, A.D. (2022). Selection, characteristics and prospects of using peptide of colostrum of cows. *Polzunovskiy vestnik*, 4 (1), 174-186. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.04.023. EDN: <https://elibrary.ru/AKJRCZ>.

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько десятилетий возрос научный интерес к биологически активным пептидам пищевого происхождения в качестве альтернативы фармакологическим методам лечения заболеваний. Развитие бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, тревожный рост грибковых инфекций, возникновение / рецидивы вирусных заболеваний, увеличение регистрируемых онкологических заболеваний по-прежнему представляют собой угрозу во всем мире. С момента обнаружения природных пептидов, способных широко поражать несколько патогенов, воздействовать на опухолевые клетки и обладать другими видами биологической активности, терапевтические средства и продукты питания с использованием пептидов оказались в поле зрения исследователей [1].

Биоактивные пептиды, выделенные из пищевых белков, признаны ценными ингредиентами функциональных продуктов питания и / или нутрицевтиков для укрепления здоровья и снижения риска хронических заболеваний [2].

Пептиды открывают многообещающие перспективы в качестве средства борьбы с распространением и повторным возникновением вирусной инфекции [3].

Недавние исследования продолжают демонстрировать потенциал использования продовольственного сырья с содержанием белковых фракций для получения биоактивных пептидов, применимых для разработки функциональных продуктов питания. Многие исследования направлены на выявление антигипертензивных, антигликемических и противовоспалительных пептидов, полученных из гидролизатов белка [4].

Особый интерес представляют мембраноактивные пептиды. Эти пептиды проявляют свою биологическую активность, взаимодействуя с клеточной мембраной, либо разрушая ее и приводя к лизису клеток, либо перемещаясь через нее, доставляя грузы в клетку и достигая своей цели. Мембраноактивные пептиды являются альтернативой используемым в настоящее время фармацевтическим препаратам и специализированным пищевым продуктам. Количество антимикробных пептидов (AMP) и пептидов, предназначенных для доставки микронутриентов, лекарств и генов в рецептуре фармакологических препаратов, увеличивается [5].

Перспективным источником пептидов является молозиво коров – сложная биологи-

ческая жидкость, содержащая антимикробные пептиды, иммунорегулирующие соединения и факторы роста. Основные функции молозива заключаются в обеспечении необходимыми питательными компонентами, укреплении естественной защитной системы, модуляции иммунного ответа, балансировании кишечной микробиоты и усилении роста и регенерации тканей. Несколько исследований и клинических испытаний, проведенных как *invitro*, так и *invivo* на людях и животных, свидетельствуют о клинической пользе добавок из молозива коров при желудочно-кишечных заболеваниях. Молозиво безопасно, поскольку не имеет противопоказаний в виде превышения дозировки [6].

Для эффективности выделения пептидов сырьё предварительно подвергают протеолизу с использованием пепсина, трипсина и других ферментов [7, 8].

Цель исследований – выделение, характеристика и оценка перспектив использования пептидов трипсинового и пепсинового гидролизата молозива коров в производстве пищевой продукции специализированного назначения и лекарственных препаратов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований:

- трипсиновый и пепсиновый гидролизаты молозива коров;
- осадок и надосадочная жидкость гидролизатов молозива коров, полученные центрифугированием гидролизатов при 3900 об/мин в течение 10 минут;
- осадок надосадочной жидкости.

Неорганические примеси удаляли из белкового осадка гидролизата молозива коров методом хроматографией с AmberlitXAD2, элюэнт: буфер А: 10 mMCH₃COONa_{pH}=6, 10 mMCH₃COONa_{pH}=4, 10 mMКCl/НСl_{pH}=1,5 с градиентом соли буфер А+0,2 %, 0,4 %, 1 % NaCl.

Фракции, надосадочные жидкости, осадок надосадочной жидкости каждого образца были разделены методом препаративной хроматографии на силикагеле, элюэнт PBS и EtOH в изократическом соотношении 9:1 соответственно. Все белковые фракции исследовали на масс-спектрометре МАЛДИ-ТОФ, расшифровку проводили с помощью базы данных Mascot, опция Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) с использованием базы данных Protein NCBI.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ

Расчет велся по формуле:

$$Score = \frac{50000}{M_{prot} \times \ln n_i}, \quad (1)$$

где M_{prot} – молекулярная масса для каждого совпавшего белка;

n – произведение, которое рассчитывается из Mowse-матрицы весов M для каждого совпадения экспериментальных данных и масс пептидов, рассчитанных из записей в геномной базе данных Protein NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аминокислотные последовательности, молекулярная масса, идентификация выделенных пептидов представлены в таблице 1. В трипсиновом гидролизате молозива коров выделено 7 пептидов, из них 1 – в белковом осадке надосадочной жидкости, 3 – в осадке гидролизата и 3 – в надосадочной жидкости. В пепсиновом гидролизате выделено 9 пептидов, из них 2 в белковом осадке надосадочной жидкости, 2 – в осадке гидролизата и 5 – в надосадочной жидкости.

Таблица 1 – Аминокислотные последовательности, молекулярная масса и идентификация выделенных пептидов

Table 1 - Amino acid sequences, molecular weight and identification of isolated peptides

Образец	Аминокислотная последовательность	Подобный белок	Score (Оптимальный Score = 80)
1	2	3	4
Надосадочная жидкость пепсинового гидролизата молозива коров			
RR1	LR EGIK NK (8)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	76
RR2	ANR K LRANK SR (11)	То же	72
RR3	MANR K LR ARSR (11)	То же	79
RR4	MR K AKCCIR (9)	Dual specificity protein phosphatase, <i>Bos taurus</i>	80
RR5	YK TV TW VCLN DFF PK KDLSL DY VL K (24)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	78
Надосадочная жидкость трипсинового гидролизата молозива коров			
TT1	EGKSPRQ CLK SR G RK GY (17)	«NCI_CGAP_Brn23 Клонк ДНК <i>Homo sapiens</i> », похож на TR: O35085 O35085 ARX HOMEOPROTEIN	89
TT2	PK CD YKRRS GP ALR TAK (17)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	68
TT3	LARKTSK IK (9)	То же	76
Осадок трипсинового гидролизата молозива коров			
T1.1	SQ KKKN CP NGTRIRVPGP GP (20)	POSSUM_01-POSSUM-C-EMBRYO-2KB, <i>Trichosurus vulpecula</i>	90
T1.2	STKRHR M HAC SWR GP LKALSNPRAE FRR (28)	BAMA, <i>Bostaurus</i>	91
T(1)	IK GS K EKLRGL KSKSF VR LFG_DLL QMGL (28)	DG9-ovary <i>Canis familiaris</i>	96
R(1)	P AFA AS SS I KA (11)	Nuclear receptor 2C2-associated protein, <i>Bos taurus</i>	90

Продолжение таблицы 1

Continuation of Table 1

1	2	3	4
Осадок пепсинового гидролизата молозива коров			
R(2)	IRHGRCVS C S R (11)	14 kDaphosphohistidine phosphatase, Pongo abelii	102
Белковый осадок надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива			
mpR1	EK LA KNK LAR GLK RK (15)	AW655195.1 105840 MARC 1BOV, Bos taurus cDNA 5'	87
mpR2	LRQLSVVV AY_KGKDVG LN D C EE ADRHK SS HRD EVS SFR RNSYS I Y EN H GP SAK C ARE VGR (60)	EV861652 protein, suscrofa	98
Белковый осадок надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива			
mpT	M H N NE TN S AS NT V NHTV TPF K IS SH KHIRTR TK KNEGKA GT ILS TALT R (49)	CO950255 protein, suscrofa	89
Надосадочная жидкость пепсинового гидролизата молозива коров			
RR1	LR EGIK NK (8)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	76
RR2	ANR K LRANK SR (11)	То же	72
RR3	MANR K LR ARSR (11)	То же	79
RR4	MR K AKCCIR (9)	Dual specificity protein phosphatase, Bos taurus	80
RR5	YK TV TW VCLN DFF PK KDLSL DY VL K (24)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	78
Надосадочная жидкость трипсинового гидролизата молозива коров			
TT1	EGKSPRQ CLK SR G RK GY (17)	«NCI_CGAP_Brn23 Клонк ДНК Homo sapiens», похож на TR: O35085 O35085 ARX HOMEOPROTEIN	89
TT2	PK CD YKRRS GP ALR TAK (17)	Подобный пептид не найден, так как уровень покрытия с известными пептидами низкий	68
TT3	LARKTSK IK (9)	То же	76
Осадок трипсинового гидролизата молозива коров			
T1.1	SQKKKNCPNGTRIRVPGPGP (20)	POSSUM_01-POSSUM-C-EMBRYO-2KB, Trichosurus Vulpecula	90
T1.2	STKRHR M HAC SWR GP LKALS- NPRAE FRR (28)	BAMA, Bostaurus	91
T(1)	IKGSKEKLRGLK- SKSFVRLFG_DLLQMGL (28)	DG9-ovary Canisfamiliaris	96
Осадок пепсинового гидролизата молозива коров			
R(1)	P AFA AS SS I KA (11)	Nuclear receptor 2C2-associated protein, Bos taurus	90
R(2)	IRHGRCVS C S R (11)	14 kDaphosphohistidine phosphatase, Pongo abelii	102
Белковый осадок надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива			
mpR1	EK LA KNK LAR GLK RK (15)	AW655195.1 105840 MARC 1BOV, Bos taurus cDNA 5'	87
mpR2	LRQLSVVVAY_KGKDVGLNDCEEA DRHKSSHRDEVSSFRN- SYSIYENHGPSAKCAREVGR (60)	EV861652 protein, sus crofa	98

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ**

Продолжение таблицы 1

Continuation of Table 1

1	2	3	4
Белковый осадок надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива			
mpT	M H N NE TN S AS NT V NHTV TPF K IS SH KHIRTR TK KNEGKA GT ILS TALT R (49)	CO950255 protein, sus scrofa	89

Следовательно, на получение пептидов методом ферментативного гидролиза влияют условия гидролиза, в частности, фермент и его оптимум активности, что согласуется с результатами исследований [9].

Из пяти пептидов RR1-RR5, выделенных из надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива коров, функции четырех пептидов (RR1, RR2, RR3 и RR5) не исследованы. Пептиды RR1 и RR4 состоят из 8 и 9 аминокислот соответственно и относятся к коротким, RR2, RR3 и RR5 – к полипептидам. Наибольшую молекулярную массу (35 кДа)

имеет пептид RR4 и характеризуется оптимальным скором – 80, что свидетельствует о высокой достоверности идентификации. По данным [10], RR4 участвует в активации MAP-киназ (MAPK), регулирующих иммунные ответы на воспалительные стимулы, стресс и повреждения тканей. Передача сигналов MAPK также обеспечивает врожденный иммунный ответ на ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP). В таблице 2 представлены молекулярная масса, биологические свойства и функции выделенных пептидов.

Таблица 2 – Молекулярная масса, свойства и функции выделенных пептидов

Table 2 - Molecular weight, properties and functions of isolated peptides

Образец	Молекулярная масса, кДа	Биологические свойства и функции пептидов (литературные данные и база данных Protein NCBI)
1	2	3
Надосадочная жидкость пепсинового гидролизата молозива коров		
RR1	9,0	Функции не изучены
RR2	8,2	То же
RR3	18,0	То же
RR4	35,0	Участвует в инактивации MAP-киназ. Дефосфорилирует ERK, JNK и p38 MAP-киназы (по сходству) Митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) играют важную роль в регуляции иммунных ответов на воспалительные стимулы, стресс и повреждения тканей у млекопитающих. Передача сигналов MAPK также играет важную роль во врожденном иммунном ответе на ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP) у рыб
RR5	15,0	Функции не изучены
Надосадочная жидкость трипсинового гидролизата молозива коров		
TT1	8,4	Агх, вероятно, играет важную роль во время эмбрионального развития ЦНС
TT2	6,5	Функции не изучены
TT3	13,0	То же
Осадок трипсинового гидролизата молозива коров		
T1.1	16	Функции не изучены
T1.2	22	Подобен белкам, которые способствуют сворачиванию и вставке белков наружной мембраны β-ствола (OMP)
T(1)	15	Функции не изучены
Осадок пепсинового гидролизата молозива коров		

Продолжение таблицы 2

Continuation of Table 2

1	2	3
R(1)	1,7	Подобен белкам, которые способны подавлять опосредованную NR2C2 трансактивацию путем связывания между NR2C2/TR4
R(2)	7	Биологическая функция остается неясной
Белковый осадок надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива		
mpR1	22	Функции неизвестны
mpR2	23	То же
Белковый осадок надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива		
mpT	18	Функции неизвестны
Надосадочная жидкость пепсинового гидролизата молозива коров		
RR1	9,0	Функции не изучены
RR2	8,2	То же
RR3	18,0	То же
RR4	35,0	Участвует в инактивации MAP-киназ. Дефосфорилирует ERK, JNK и p38 MAP-киназы (по сходству) Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) играют важную роль в регуляции иммунных ответов на воспалительные стимулы, стресс и повреждения тканей у млекопитающих. Передача сигналов МАРК также играет важную роль во врожденном иммунном ответе на ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны (PAMP) у рыб
RR5	15,0	Функции не изучены
Надосадочная жидкость трипсинового гидролизата молозива коров		
TT1	8,4	Агх, вероятно, играет важную роль во время эмбрионального развития ЦНС
TT2	6,5	Функции не изучены
TT3	13,0	То же
Осадок трипсинового гидролизата молозива коров		
T1.1	16	Функции не изучены
T1.2	22	Подобен белкам, которые способствуют сворачиванию и вставке белков наружной мембраны β -ствола (OMP)
T(1)	15	Функции не изучены
Осадок пепсинового гидролизата молозива коров		
R(1)	1,7	Подобен белкам, которые способны подавлять опосредованную NR2C2 трансактивацию путем связывания между NR2C2/TR4
R(2)	7	биологическая функция остается неясной
Белковый осадок надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива		
mpR1	22	Функции неизвестны
mpR2	23	То же
Белковый осадок надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива		
mpT	18	Функции неизвестны

По данным [11], активация MAP-киназ и каскадов фосфорилирования являются ключевыми для инициации активации иммунных клеток в ответ на распознавание антигена и ощущение микробной опасности. Исследования на нокаутированных мышах подтвердили важные функции нескольких фосфатаз DUSP (фосфатазы двойной специфичности, рисунок 1) – MAP-киназ (DUSP-МКР) в контроле воспалительных и антимикробных иммунных реакций, что подтверждает концепцию, согласно которой отдельные DUSP-МКР фор-

мируют и определяют исход врожденных иммунных реакций из-за контекстно-зависимой экспрессии и селективного ингибирования различных митоген-активированных протеинкиназ (МАРК). Следовательно, изучение влияния выделенного пептида RR4 на иммунный ответ представляет определенный интерес.

Из рисунка 1 следует, что 10 членов классических фосфатаз DUSP-МАРК содержат МАРК-связывающий мотив взаимодействия с киназой (КИМ), обеспечивающий селективное связывание с ERK1/2, p38 или

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ

JNK1/2. После связывания с MAPK каталитический домен DUSP (DCD) дефосфорилирует мотив TXY в петле активации (правая панель).

Атипичные DUSP не имеют KIM и могут иметь более разнообразные субстраты, включая фосфорилированную РНК (DUSP11).

Регулируемая экспрессия между типами клеток и после стимуляции, различная компартиментализация DUSP и избирательность в связывании с членами семейства MAPK придают специфичность действию DUSP в передаче сигналов.

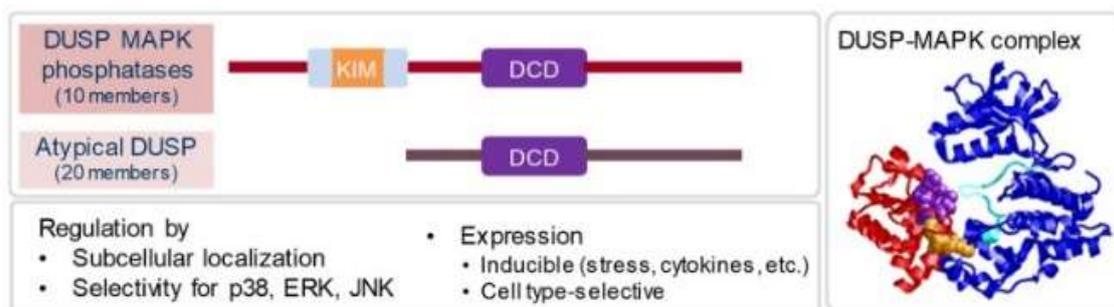


Рисунок 1 – Фосфатазы двойной специфичности: доменная структура, способ действия и уровни регуляции [11]

Figure 1 - Phosphatases of dual specificity: domain structure, mode of action and levels of regulation

В надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров выделено три пептида ТТ1, ТТ2 и ТТ3. ТТ1 и ТТ2 состоят из 17 аминокислот и относятся к полипептидам, ТТ3 состоит из 9 аминокислот и представляет короткий пептид. Все выделенные пептиды надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива коров имеют различную молекулярную массу. Наибольшую молекулярную массу имеет короткий пептид ТТ3, которая составляет 13 кДа. Аналоги пептидов и пептиды ТТ3 и ТТ2 не идентифицируются в известных протеомных базах данных, и функции указанных пептидов не установлены. Пептид ТТ1 идентифицируются как пептид «NCI_CGAP_Brn23 Клонк ДНК Homo sapiens» и сходен с пептидом TR: O35085 O35085 ARXHOMEOPROTEIN.

На основании ресурсов основных данных ELIXIR, имеющих фундаментальное значение для более широкого сообщества в области естественных наук и долгосрочного сохранения биологических данных, белок O35085 Arx является фактором транскрипции, необходимый для нормального развития мозга и важен для поддержания определенных подтипов нейронов в коре головного мозга, наведения аксонов в пластине пола (по сходству). Рекомензуемое название Гомеобокс протеин ARXENSMUSG00000035277 экспрессируется в ростральном миграционном потоке.

Согласно данным [12], пептид ТТ1 идентифицируется как NCI_CGAP_Brn23 или Arx белок. На ранних стадиях развития Arx экс-

прессируется в значительной доле нейронов в коре головного мозга, полосатом теле, ганглионарных возвышенностях, а также в спинном мозге. У взрослого человека экспрессия Arx все еще присутствует и ограничена областями, такими, как миндалины и обонятельные луковицы, которые, как известно, содержат ГАМКергические нейроны. Возможная роль Arx в этом типе нейронов дополнительно подтверждается экспрессией Arx в подмножестве ГАМКергических интернейронов в молодых и зрелых первичных культурах кортикальных нейрональных клетках, а также *in vivo*.

С недостатком и мутацией Arx из-за неправильной локализации или дисфункции ГАМКергических нейронов белка связано возникновение судорог у подавляющего большинства пациентов. Следует отметить, что различные протестированные мутации Arx не изменяли морфологию клеток. Более того, не наблюдалось аномальной гибели клеток или агрегации белка, что позволяет предположить, что задействованы более тонкие патогенные механизмы.

В результате исследований [13], установлено, что X-сцепленный ген, кодирующий гомеобокс, связанный с *aristaless* (Arx), является бифункциональным фактором транскрипции, способным активировать или подавлять транскрипцию генов, мутации которых были обнаружены при широком спектре нарушений развития нервной системы (NDDs), к ним относятся пороки развития коры головного мозга, детская эпилепсия, ум-

ственная отсталость (ID) и аутизм. Следовательно, выделенный нами пептид из надосадочной жидкости ферментативного гидролизата молозива коров обладает важными свойствами, обеспечивающими нормальное функционирование нервной системы.

В осадке трипсинового гидролизата молозива коров выделено три полипептида Т1.1 (идентифицирован как «POSSUM_01-POSSUM-C-EMBRYO-2KB, *Trichosurus Vulpecula*»), Т1.2 (BAMA, *Bostaurus*) и Т (1) (DG9-ovary *Canisfamiliaris*) с молекулярными массами 16, 22 и 15 кДа соответственно. Пептиды Т1.2 и Т(1) состоят из 28 аминокислот, пептид Т1.1 состоит из 20 аминокислот.

Функции пептидов «POSSUM_01-POSSUM-C-EMBRYO-2KB, *Trichosurus Vulpecula*» и «DG9-ovary *Canisfamiliaris*» еще не исследованы. Пептид «BAMA, *Bostaurus*» по данным [14], подобен белкам, способным встраиваться во внешнюю мембрану β-ствола (ОМР) грамотрицательных бактерий. Этот процесс опосредуется мультибелковым комплексом BAM, состоящим из незаменимого β-барреля OMPBamA и четырех липопротеинов (BamBCDE). Периплазматический домен BamA является ключевым для его функции и содержит пять повторов, связанных с полипептидным транспортом (POTRA).

Согласно данным, представленным в работе [15], грамотрицательные бактерии обладают трехслойной оболочкой, состоящей из внутренней мембраны, окруженной слоем пептидогликана (PG), который имеет внешнюю мембрану, обеспечивающую бактериям защиту от различных агрессивных сред, что является эффективным барьером против антибиотиков. Слои оболочки соединены друг с другом посредством множества белковых взаимодействий. Бактерии имеют сложные механизмы, которые поддерживают целостность и функциональность каждого слоя. Например, механизм сборки β-цилиндров (BAM) отвечает за внедрение интегральных белков внешней мембраны, включая белок механизма транспорта липополисахаридов LptD.

Прогнозируемые функциональные партнеры белкового соединения O35085 Arg, по

данным [15], представлены в таблице 3. На рисунке 2 представлен механизм сборки баррелей (BAM) иммунофлуоресценции на клетках *E. Coli*.

На основании механизма сборки баррелей (BAM) на клетках *E. Coli*, представленным в работе [15], можно предположить, что пептид «BAMA, *Bostaurus*» относится к мембраноактивным или противовирусным. Автор [16] утверждает, что такие пептиды ингибируют проникновение множества неродственных вирусов в клетки. Противовирусные пептиды широкого спектра действия обладают межфазной активностью; они в некоторой степени гидрофобны и амфипатичны, со склонностью взаимодействовать с межфазными зонами липидных бислоевых мембран.

Из анализа литературных данных по противовирусной активности пептида «BAMA, *Bostaurus*» следует, что указанный пептид можно использовать в составе продуктов питания специализированного назначения, в частности, для профилактики вирусных и бактериальных инфекций, но после подтверждения эффективности в доклинических и клинических исследованиях.

В осадке пепсинового гидролизата молозива коров выделено два известных полипептида «Nuclearreceptor 2C2-associatedprotein, *Bostaurus*» и «14 kDaphosphohistidinephosphatase, *Pongoabelii*», состоящих из 11 аминокислот с молекулярной массой 1,7 и 7 кДа соответственно. Согласно данным, представленным в работах [17, 18], пептид «Nuclearreceptor 2C2associatedprotein, *Bostaurus*» подобен белкам, которые способны подавлять опосредованную NR2C2 трансактивацию путем связывания между NR2C2/TR4, что препятствует возникновению рака. Авторы [17] на основании гипотезы существования единой схемы экспрессии и регуляции генов для разных типов рака и собственных исследований установили, что среди некодирующих генов длинные некодирующие РНК (lncRNAs) становятся ключевыми регуляторами генов, играющими важную роль в возникновении рака.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ

Таблица 3 – Прогнозируемые функциональные партнеры белкового соединения O35085 Arg

Table 3 - Predicted functional partners of a protein compound O35085 Arg [15]

Белок	Характеристика
Tlx2	Белок 2 гомеобокса при Т-клеточном лейкозе; Активатор транскрипции, который связывает элементы ДНК с консенсусной последовательностью 5'-CGGTAATTGG-3'. Связывает ДНК через свой гомеобокс. Требуется для нормальной гибели клеток кишечных нейронов в желудочно-кишечном тракте. Требуется для нормального развития кишечной нервной системы и для правильного развития нормальной моторики желудочно-кишечного тракта
Tlx3	Белок 3 гомеобокса при Т-клеточном лейкозе; Т-клеточный лейкоз, гомеобокс 3
Lmo1	Домен Lim только 1; Ромботин-1; Может быть вовлечен в регуляцию генов в клетках нервной линии, потенциально путем прямого связывания с ДНК или путем связывания с другими факторами транскрипции
Sh2d1a	Белок 1A, содержащий домен SH2; Цитоплазматический адаптер, регулирующий рецепторы семейства сигнальных молекул активации лимфоцитов (SLAM), таких как SLAMF1, CD244, LY9, CD84, SLAMF6 и SLAMF7. Передача сигналов в SLAM, по-видимому, взаимодействует с SH2D1B / EAT-2. Первоначально было высказано предположение, что ассоциация с SLAMF1 предотвращает связывание SLAMF1 с ингибирующими эффекторами, включая INPP5D/ SHIP1 и PTPN11/SHP-2. Однако при одновременном взаимодействии рекрутирует FYN, который впоследствии фосфорилирует и активирует SLAMF1 (по сходству). Положительно регулирует CD244 / 2B4- и CD84-опосредованный естественный киллер (NK) [15]
Tlx1	Белок гомеобокса Т-клеточного лейкоза 1; Контролирует генез селезенки. Связывается с последовательностью ДНК 5'-GGCGGTAAGTGG-3'
Neurog3	Нейрогенин-3; Действует как регулятор транскрипции, вместе с NKX2- 2 инициирует активацию транскрипции NEUROD1. Участвует в нейрогенезе. Нужен для определения общего предшественника 4 типов эндокринных клеток поджелудочной железы
Gcg	Глюкагон; Глицентин может модулировать секрецию желудочной кислоты и желудочно-пилоро-дуоденальную активность
Pcdh19	Протокадерин дельта 2; Протокадерин-19; Потенциальный кальцийзависимый белок клеточной адгезии
Ppy	Панкреатический полипептид. Прогормон поджелудочной железы. Гормон поджелудочной железы синтезируется в панкреатических островках Лангерганса и действует как регулятор функций поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта
Ipo13	Импортин-13; Функционирует при импорте ядерного белка в качестве рецептора ядерного транспорта. Служит рецептором для сигналов ядерной локализации (NLS) в грузовых субстратах. Считается, что он опосредует стыковку комплекса импортин/субстрат с ядерно-поровым комплексом (NPC) посредством связывания с нуклеопорином, и комплекс впоследствии перемещается через пору с помощью энергозатратного механизма, зависящего от Ran. На нуклеоплазматической стороне NPC Ran связывается с импортин, комплекс импортин / субстрат диссоциирует, и импортин реэкспортируется из ядра в цитоплазму, где происходит гидролиз GTP [15]

Используя данные TCGARNAseq, авторы [17] проанализировали кодирующую (мРНК) и некодирующую (lncRNA) экспрессию генов в 15 и 9 распространенных типах рака соответственно. Было изучено 70 значительно дифференцированно экспрессируемых генов, общих для всех 15 типов рака. Коррелируя с уровнями экспрессии белка из Атласа белков человека, было установлено 34 положительно коррелированных набора генов, которые обогащены экспрессией генов, транскрипцией из РНК Pol-II, регуляцией тран-

скрипции и биологических процессов митотического клеточного цикла. Доказано, что «Nuclearreceptor 2C2associatedprotein, Bostaurus» участвует в одних и тех же биологических процессах при регуляции транскрипции РНК Pol-II и предупреждает развитие рака.

Биологическая функция пептида «14 kDaphosphohistidinephosphatase, Pongabelii» остается неясной. Белковый осадок надосадочной жидкости пепсинового гидролизата молозива содержит два полипептида mpR1 и mpR2, которые идентифицированы

как пептиды «AW655195.1 105840 MARC 1BOV, BostauruscDNA 5'» и «EV861652 protein, susscrofa», состоящие из 15 и 60 аминокислот. Функции пептидов не исследованы. В белковом осадке надосадочной жидкости трипсинового гидролизата молозива выделен полипептид «CO950255 protein, susscrofa», состоящий из 49 аминокислот и имеющий молекулярную массу 18 кДа, функции которого также не изучены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выделение биологически активных пептидов из животного сырья и введение в состав специализированной пищевой продукции, а также создание на их основе фармакологических препаратов может стать альтернативой применению антибиотиков и других лекарств. Установлено, что на количественный и качественный состав пептидов ферментативного гидролизата молозива коров влияет используемый протеолитический фермент. Так, в трипсиновом гидролизате молозива коров выделено 7 пептидов, в пепсиновом гидролизате – 9 пептидов.

Полученные пептиды отличаются количеством аминокислот, молекулярной массой и скором. Из 16 пептидов, выделенных из ферментативного гидролизата молозива коров, 9 пептидов идентифицированы, из них только у 4 исследованы и доказаны некоторые биологические функции. Пептид, названный нами RR4 и идентифицированный как «Dualspecificityproteinphosphatase, Bostaurus», состоит из 9 аминокислот MRKAKCCIR и заслуживает особого внимания, так как может активизировать иммунный ответ. Выделенный пептид «NCI_CGAP_Brn23 Клон к ДНК Homo sapiens» сходен с пептидом «TR: O35085 O35085 ARXHOMEOPROTEIN», который необходим для нормального развития и функционирования центральной нервной системы.

Интересен пептид «BAMA, Bostaurus» способный встраиваться во внешнюю мембрану β -ствола (OMP) бактерий, что позволяет его использовать как переносчик грузов (лекарств, биологически активных веществ) в клетки организма для поддержания жизнедеятельности или борьбы с вирусными инфекциями, а возможно, для гибели опухолевых клеток. Выделенный пептид «Nuclearreceptor 2C2-associatedprotein, Bostaurus» препятствует возникновению рака. Мы предполагаем, что молекулярные и биологические характеристики выделенных пептидов могут быть использованы для разработки, оптимизации

или молекулярной эволюции новых продуктов специализированного назначения, а также противовирусных, антибактериальных и противораковых терапевтических средств широкого спектра действия. Необходимо учитывать, что препятствиями при применении пептидов являются два фактора: наличие или отсутствие корреляции между структурой пептида и его действием и демонстрация его стабильности *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vanzolini, T. [et al]. Multitalented synthetic antimicrobial peptides and their antibacterial, antifungal and antiviral mechanisms // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 1. – <https://doi.org/10.3390/ijms23010545>.
2. Amigo, L., Hernández-Ledesma, B. Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – № 19. – <https://doi.org/10.3390/molecules25194479>.
3. Al-Azzam, S. [et al]. Peptides to combat viral infectious diseases // *Peptides*. – 2020. – V. 134. – <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170402>.
4. Hall, F., Reddivari, L., Liceaga, A.M. Identification and characterization of edible cricket peptides on hypertensive and glycemic *in vitro* inhibition and their anti-inflammatory activity on RAW 264.7 macrophage cells // *Nutrients*. – 2020. – V. 12. – № 11. – <https://doi.org/10.3390/nu12113588>.
5. Avci, F.G., Sariyar Akbulut, B., Ozkirimli, E. Membrane active peptides and their biophysical characterization // *Biomolecules*. – 2018. – V. 8. – № 3. – <https://doi.org/10.3390/biom8030077>.
6. Menchetti, L. [et al]. Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases // *Frontiers in Bioscience-Scholar*. – 2016. – V. 8. – № 2. – <https://doi.org/10.2741/s467>.
7. Tripoteau, L. [et al]. *In vitro* antiviral activities of enzymatic hydrolysates extracted from byproducts of the Atlantic holothurian *Cucumaria frondosa* // *Process Biochemistry*. – 2015. – V. 50. – № 5. – <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.02.012>.
8. Salampeyy, J. [et al]. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins // *Journal of functional foods*. – 2015. – V. 14. – <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.037>.
9. Alvarez, J.C. Hair analysis does not allow to discriminate between acute and chronic administrations of a drug in young children // *International journal of legal medicine*. – 2017. – № 132 (1). – <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1720-5>.
10. Li, S. [et al]. Comparative analysis of dual specificity protein phosphatase genes 1, 2 and 5 in response to immune challenges in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* // *Fish & Shellfish Immunology*. – 2017. – V. 68. – <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.042>.
11. Lang, R., Raffi, F.A.M. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: an update // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – V. 20. – № 11. – <https://doi.org/10.3390/ijms20112710>.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЕПТИДОВ МОЛОЗИВА КОРОВ

12. Poirier, K. [et al]. Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons // *Molecular brain research*. – 2004. – V. 122. – № 1. – <https://doi.10.1016/j.molbrainres.2003.11.021>.
13. Poeta, L. [et al]. Further Delineation of Duplications of ARX Locus Detected in Male Patients with Varying Degrees of Intellectual Disability // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – V. 23. – № 6. – <https://doi.10.3390/ijms23063084>.
14. Gatzeva-Topalova, P.Z. [et al]. Structure and flexibility of the complete periplasmic domain of BamA: the protein insertion machine of the outer membrane // *Structure*. – 2010. – T. 18. – № 11. – <https://doi.10.1016/j.str.2010.08.012>.
15. Consoli, E., Collet, J.F., den Blaauwen, T. The Escherichia coli Outer Membrane β -Barrel Assembly Machinery (BAM) Anchors the Peptidoglycan Layer by Spanning It with All Subunits // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – T. 22. – № 4. – <https://doi.10.3390/ijms22041853>.
16. Hoffmann, A.R. [et al]. Broad-spectrum antiviral entry inhibition by interfacially active peptides // *Journal of Virology*. – 2020. – T. 94. – № 23. – <https://doi.10.1128/JVI.01682-20>.
17. Saleemhasha, A., Mishra, S. Long non-coding RNAs as pan-cancer master gene regulators of associated protein-coding genes: a systems biology approach // *PeerJ*. – 2019. – V. 7. – <https://doi.10.7717/peerj.6388>.
18. Yang, Y. [et al]. Identification of a novel testicular orphan receptor-4 (TR4)-associated protein as repressor for the selective suppression of TR4-mediated transactivation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – № 9. – <https://doi.10.1074/jbc.M207116200>.

Информация об авторах

С. Л. Тихонов – доктор технических наук, заведующий кафедрой «Пищевой инженерии» Уральского государственного экономического университета.

Н. В. Тихонова – доктор технических наук, профессор кафедры «Пищевой инженерии» Уральского государственного экономического университета.

И. Г. Данилова – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

А. С. Ожгихина – аспирант Южно-Уральского государственного аграрного университета.

М. С. Тихонова – студент Уральского государственного медицинского университета.

А. Д. Поповских – студент Уральского государственного экономического университета.

REFERENCES

1. Vanzolini, T. [et al]. (2022). Multitalented synthetic antimicrobial peptides and their antibacterial, antifungal and antiviral mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.10.3390/ijms23010545>.
2. Amigo, L. & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. *Molecules*, 25(19). <https://doi.10.3390/molecules25194479>.
3. Al-Azzam, S. [et al]. (2020). Peptides to combat viral infectious diseases. *Peptides*, 134. <https://doi.10.1016/j.peptides.2020.170402>.
4. Hall, F., Reddivari, L. & Liceaga, A.M. (2020). Identification and characterization of edible cricket peptides on hypertensive and glycemic in vitro inhibition and their anti-inflammatory activity on RAW 264.7 macrophage cells. *Nutrients*, 12(11). <https://doi.10.3390/nu12113588>.
5. Avci, F.G., Sariyar Akbulut, B. & Ozkirimli, E. (2018). Membrane active peptides and their biophysical characterization. *Biomolecules*, 8(3). <https://doi.10.3390/biom8030077>.
6. Menchetti, L. [et al]. (2016). Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 8(2). <https://doi.10.2741/s467>.
7. Tripoteau, L. [et al]. (2015). In vitro antiviral activities of enzymatic hydrolysates extracted from byproducts of the Atlantic holothurian *Cucumaria frondosa*. *Process Biochemistry*, 50(5). <https://doi.10.1016/j.procbio.2015.02.012>.
8. Salampessy, J. [et al]. (2015). Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of functional foods*, 14. <https://doi.10.1016/j.jff.2015.02.037>.
9. Alvarez, J.C. (2017). Hair analysis does not allow to discriminate between acute and chronic administrations of a drug in young children. *International journal of legal medicine*. 132(1). <https://doi.10.1007/s00414-017-1720-5>.
10. Li, S. [et al]. (2017). Comparative analysis of dual specificity protein phosphatase genes 1, 2 and 5 in response to immune challenges in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 68. <https://doi.10.1016/j.fsi.2017.07.042>.
11. Lang, R. & Raffi, F.A.M. (2019). Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: an update. *International journal of molecular sciences*. 20(11). <https://doi.10.3390/ijms20112710>.
12. Poirier, K. [et al]. (2004). Neuroanatomical distribution of ARX in brain and its localisation in GABAergic neurons. *Molecular brain research*, 122(1). <https://doi.10.1016/j.molbrainres.2003.11.021>.
13. Poeta, L. [et al]. (2022). Further Delineation of Duplications of ARX Locus Detected in Male Patients with Varying Degrees of Intellectual Disability. *International journal of molecular sciences*, 23(6). <https://doi.10.3390/ijms23063084>.
14. Gatzeva-Topalova, P.Z. [et al]. (2010). Structure and flexibility of the complete periplasmic domain of BamA: the protein insertion machine of the outer membrane. *Structure*, 18(11). <https://doi.10.1016/j.str.2010.08.012>.

15. Consoli, E., Collet, J.F. & den Blaauwen, T. (2021). The Escherichia coli Outer Membrane β -Barrel Assembly Machinery (BAM) Anchors the Peptidoglycan Layer by Spanning It with All Subunits. *International journal of molecular sciences*. 22(4). <https://doi.10.3390/ijms22041853>.

16. Hoffmann, A.R. [et al]. (2020). Broad-spectrum antiviral entry inhibition by interfacially active peptides. *Journal of Virology*, 94(23). <https://doi.10.1128/JVI.01682-20>.

17. Salembhasha, A. & Mishra, S. 2019. Long non-coding RNAs as pan-cancer master gene regulators of associated protein-coding genes: a systems biology approach. *Peer J.*, 7. <https://doi.10.7717/peerj.6388>.

18. Yang, Y. [et al]. (2003). Identification of a novel testicular orphan receptor-4 (TR4)-associated protein as repressor for the selective suppression of TR4-mediated transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9). <https://doi.10.1074/jbc.M207116200>.

Information about the authors

S. L. Tikhonov - Doctor of Technical Sciences, Head of the Department of «Food Engineering» of the Ural State University of Economics.

N. V. Tikhonova - Doctor of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of «Food Engineering» of the Ural State University of Economics.

I. G. Danilova - Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology of the Russian Academy of Sciences.

A. S. Ozhgihina - Postgraduate student of the South Ural State Agrarian University.

M. S. Tikhonova - student of the Ural State Medical University.

A. D. Popovskih - student of the Ural State University of Economics.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.*

Статья поступила в редакцию 10.08.2022; одобрена после рецензирования 24.09.2022; принята к публикации 03.10.2022.

The article was received by the editorial board on 10 Aug 2022; approved after editing on 24 Sep 2022; accepted for publication on 03 Oct 2022.