

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПОВРЕЖДЕННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

М. В. Исакина, Э. С. Ревина, В. А. Плисов, Н. В. Ревина

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»

Поступила в редакцию 24.07.14г.

Аннотация. Исследовано изменение липидного состава и состояние мембран при повреждении периферических нервов крысы и действии фермента – гиалуронидазы. Показано, что введение гиалуронидазы при патологии периферических нервов сопровождается изменением жирнокислотного состава отдельных липидных фракций. Установлено, что использование данного фермента в качестве разрушающего агента внеклеточного матрикса не способствует нормализации количественного и качественного состава жирных кислот. С помощью метода оптического имиджинга, основанного на определении интенсивности флуоресценции, было выявлено изменение метаболической активности, что свидетельствует о нарушении процесса восстановления структуры и состава мембран нервных проводников.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, гиалуронидаза, свободные жирные кислоты, диацилглицерин, фосфолипиды, патология периферических нервов, оптический имиджинг.

Abstract. It has studied the change of lipid composition and state of the membrane of a rat's damaged peripheral nerves and the action of the enzyme – hyaluronidase. It has shown that the administration of hyaluronidase in the pathology of the peripheral nerves accompanied by changes in the fatty acid composition of individual lipid fractions. Established that the use of this enzyme as a destructive agent of extracellular matrix doesn't contribute the normalization of quantitative and qualitative composition of fatty acids. Using the optical imaging method based on identifying the intensity of fluorescence we detected the change in metabolic activity, indicating an inappropriate repair process the membranes composition and structure of nerve guides.

Keywords: hyaluronic acid, hyaluronidase, free fatty acid, diacylglycerol, phospholipid, peripheral nerve pathologies, optical imaging.

Ежегодно в мире проводится более 2 млн. операций с целью восстановления посттравматического дефекта периферических нервов. Несмотря на широкое применение различных подходов и методов лечения, степень инвалидизации остается достаточно высокой, а сроки восстановления функций нервных проводников – длительными [1]. Поэтому в настоящее время одной из наиболее актуальных проблем является поиск возможных путей оптимизации аксональной регенерации. Использование биологически активных веществ представляется перспективным направлением для стимуляции посттравматической регенерации нервных проводников. В качестве такого стимулятора особый интерес вызывает гиалуроновая кислота [2, 3]. Она является одним из основных компонентов межклеточного матрикса – физиологической среды

для миграции, деления и дифференцировки клеток. Многочисленными исследованиями показано, что гиалуроновая кислота представляет собой не только статичную и структурообразующую молекулу, но и молекулу, принимающую активное участие в регуляции биологических процессов. Она модулирует процессы регенерации и репарации, участвует в пролиферации и миграции клеток, влияет на процессы ангиогенеза, обладает антиоксидантной активностью [4 – 6]. В последнее время в литературе все чаще встречаются работы по применению препаратов гиалуроновой кислоты [7 – 10]. Сообщается, что высокомолекулярная форма гиалуроновой кислоты обеспечивает пролиферацию и самоподдержание нейрональных стволовых клеток. Таким образом, ускоряя регенеративные процессы, гиалуроновая кислота способствует восстановлению свойств клеточных мембран, одним из основных компонентов которых являются липиды [11].

Установлено, что дегенерация нерва, вызванная его перерезкой, сопровождается изменением липидного состава нервного волокна, образованием большого числа метаболитов липидной природы – 1,2 – диацилглицерола (ДАГ), свободных жирных кислот (СЖК), лизолипидов, которые принимают активное участие в регуляции функционирования нервного волокна [12 – 17].

Также установлено, что гиалуроновая кислота проходит стадии от высокомолекулярного полимера до коротких полисахаридных фрагментов под действием фермента – гиалуронидазы [4]. Недавние исследования продемонстрировали, что эти фрагменты (в частности, тетрасахаридные остатки гиалуроновой кислоты) приобретают новые свойства, защищая нейроны от гибели и способствуя их регенерации [18]. Сообщается, что повышение активности гиалуронидаз является одним из стимулирующих факторов для повышения активности фибробластов, участвующих в синтезе новых молекул гиалуроновой кислоты [6]. С другой стороны, было показано, что разрушение внеклеточного матрикса путем деградации гиалуроновой кислоты приводит к модуляции биоэлектрической активности нейронных сетей мозга с формированием стойкой эпилептоподобной активности [19]. Поэтому, вполне возможно, что ферментативное расщепление гиалуроновой кислоты является одним из механизмов регуляции метаболизма на клеточном уровне. В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение влияния гиалуронидазы на изменение липидного состава и состояния клеточных мембран при патологии периферических нервов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования данной работы служили седалищные нервы белых беспородных крыс массой 170 – 290 г, а также липиды, выделенные из них. Для создания модели патологии на уровне середины бедра проводили перевязку седалищного нерва крысы. У животных одной группы, наркотизированных диэтиловым эфиром обнажали седалищный нерв, накладывали на него лигатуру и перевязывали. По окончании препаровки рану зашивали. У животных второй группы после перевязки нерва в область бедра через день вводили раствор гиалуронидазы (10 ЕД/мл). Извлечение нервов осуществляли через 5, 10 и 30 суток. Контролем служили интактные животные. Экстракцию липидов из нервной ткани проводили по методу Блайя-Дайера [20]. Состав фосфолипидов анализировали методом одномерной хроматографии на

силикагеле в системе растворителей хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4). Количественное определение фосфолипидов осуществляли с помощью денситометрического автоматизированного комплекса CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Для разделения СЖК и ДАГ использовали систему гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (60:40:1 по объему) [21]. ЖК-состав анализировали на газовом хроматографе фирмы Shimadzu GS 2010 (Япония). Жирные кислоты метилировали с помощью раствора трехфтористого бора в метаноле [22]. Отдельные фракции фосфолипидов идентифицировали с использованием значений R_f, специфических окрашивающих агентов и свидетелей (Supelco). Для определения интенсивности флуоресценции нервных проводников использовался метод оптического имиджинга на основе системы визуализации IVIS[®]LuminaII (США). Данный метод исследования предназначен для неинвазивной прижизненной (*in vivo*) визуализации живых объектов малых размеров с целью изучения метаболической активности клеток и тканей в режиме реального времени. Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первым этапом нашего исследования явилось изучение изменения содержания свободных жирных кислот (СЖК) в контрольных и поврежденных седалищных нервах крысы. В составе фракции СЖК было обнаружено 15 жирных кислот (ЖК), из которых в контроле преобладают насыщенные ЖК, а коэффициент насыщенности составляет 8.4. Через 5 суток после перевязки нерва наблюдается увеличение доли ненасыщенных жирных кислот – главным образом, олеиновой, линолевой и арахидоновой. При этом коэффициент насыщенности снижается в 3.2 раза. С увеличением послеоперационных сроков до 10 суток соотношение насыщенные/ненасыщенные ЖК меняется незначительно. Однако наблюдается заметное возрастание содержания арахидоновой кислоты, которая является важным медиатором, участвующим в передаче клеточных сигналов. Таким образом, при перевязке седалищного нерва наблюдаются значительные изменения содержания СЖК в поврежденном нервном проводнике. Возрастание доли ненасыщенных жирных кислот можно объяснить увеличением активности фосфолипазы А₂, которая катализирует гидролиз фосфолипидов в основном, в *sn*-2 положении, харак-

терном для полиненасыщенных ЖК – линолевой, арахидоновой, линоленовой [17].

Однако, увеличение времени повреждающего воздействия до 30 суток сопровождается снижением уровня СЖК. При этом коэффициент насыщенности возрастает за счет изменения соотношения насыщенные/ненасыщенные ЖК в сторону уменьшения содержания ненасыщенных ЖК. Это согласуется с литературными данными, указывающими на то, что дегенерация заканчивается на 5-7 сутки после травмы нерва [16], а репаративная регенерация миелиновых оболочек нервных волокон активно протекает до 30-х суток после пережатия нерва и продолжается до 50-х суток эксперимента [9].

На следующем этапе было исследовано изменение жирнокислотного состава нерва при введении ферментного препарата – гиалуронидазы, который способен к рассасыванию глиальных и адгезивных образований, в том числе комплексов гиалуроната с различными белками и протеогликанами [23, 24]. Согласно полученным данным, в серии опытов с введением препарата на 5 сутки наблюдения происходит увеличение содержания олеиновой и арахидоновой ЖК в среднем в 3.3 раза относительно контроля: коэффициент насыщенности составил 1.3. Увеличение длительности перетяжки с последующим введением гиалуронидазы не привело к существенным изменениям, и на 30-е сутки эксперимента он снизился до 0.8, что на 90.2% ниже контрольного значения (Рис. 1). Из полученных результатов видно, что использование гиалуронидазы в качестве разрушающего внеклеточный матрикс агента не способствует нормализации жирнокислотного состава поврежденных нервных проводников.

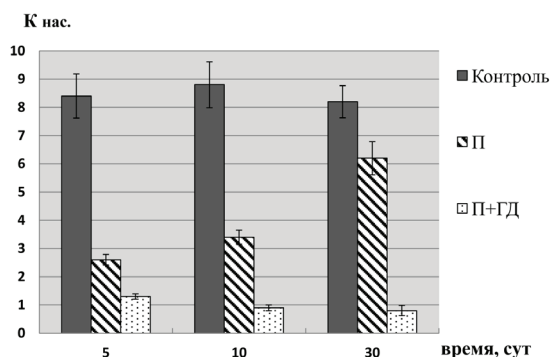


Рис. 1. Изменение коэффициента насыщенности фракции свободных жирных кислот при повреждении седалищного нерва и введении гиалуронидазы. Обозначения: П – повреждение, П+ГД – повреждение+гиалуронидаза

Так, в серии опытов с гиалуронидазой к 30-м суткам эксперимента содержание всех ненасыщенных жирных кислот возрастает в среднем в 2 раза относительно серии опытов с повреждением. По-видимому, увеличение количества ненасыщенных жирных кислот при действии гиалуронидазы обуславливает торможение регенерационных процессов, в которых определяющую роль играет степень нормализации жирнокислотного состава мембранных липидов.

Помимо фракции СЖК, были исследованы изменения жирнокислотного состава фракции диацилглицерина (ДАГ), который является одним из активных вторичных мессенджеров, влияющих на передачу внутриклеточных сигналов [25]. В составе данной фракции было идентифицировано 16 жирных кислот. Насыщенные ЖК в основном представлены пальмитиновой и стеариновой: 35% и 22% соответственно, а ненасыщенные – линоленовой (12%). Через 5 суток после травмы значительно увеличилось содержание линолевой, линоленовой и арахидоновой ЖК: в среднем в 4.7, 1.7 и 3.0 раза соответственно. Следует отметить, что уровень насыщенных жирных кислот снижается: значительные изменения претерпевает пальмитиновая кислота, доля которой уменьшается на 64.8%. В период от 5-ти до 10-ти суток существенных изменений не наблюдается, при этом коэффициент насыщенности составляет 1.08. Через 30 суток повреждающего воздействия количество ненасыщенных жирных кислот уменьшается, а процент насыщенных, в основном декановой и пальмитиновой, возрастает. Следует отметить, что коэффициент насыщенности возрастает, приближаясь к контрольному значению, и составляет 1.98 (Рис. 2).

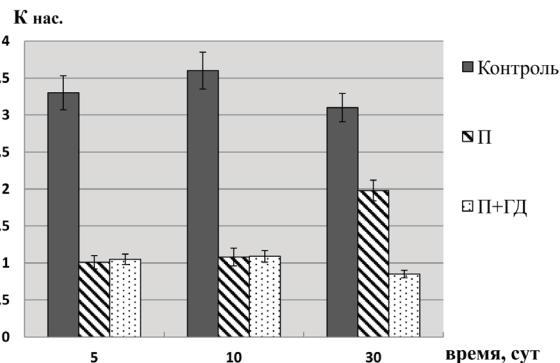


Рис. 2. Изменение коэффициента насыщенности жирных кислот диацилглицерина при повреждении седалищного нерва и введении гиалуронидазы. Обозначения: П – повреждение, П+ГД – повреждение+гиалуронидаза

Введение ферментного препарата не приводит к существенным изменениям на 5-е и 10-е сутки эксперимента. Однако к 30-м суткам использование гиалуронидазы вызывает заметные изменения в распределении жирных кислот в составе фракции диацилглицерина. Содержание насыщенных ЖК, таких как лауриновая, пальмитиновая и стеариновая снижается в среднем в 2 раза, а уровень ненасыщенных – олеиновой, линоленовой, арахидоновой и гондоиновой возрастает в среднем в 1.8 раза. Эти изменения происходят, вероятнее всего, из-за влияния продуктов распада гиалуроновой кислоты, образующихся под действием фермента, и коэффициент насыщенности в этом случае снижается на 57% по сравнению с аналогичным вариантом опыта без использования препарата.

В общей фракции фосфолипидов наблюдаются аналогичные изменения количественного состава жирных кислот. В данной фракции было обнаружено 11 жирных кислот, среди которых доминируют ненасыщенные ЖК: олеиновая и линоленовая. При перевязке нерва через 5 суток происходит увеличение ненасыщенных жирных кислот, в результате чего коэффициент насыщенности снижается в 2 раза и составляет 0.62. На 10-е сутки происходит незначительное уменьшение ненасыщенных ЖК, при этом коэффициент насыщенности снижается на 27% относительно контроля. С увеличением послеоперационных сроков до 30-ти суток соотношение насыщенных/ненасыщенных жирных кислот приближается к контрольным значениям в результате развития репаративных процессов в травмированных нервных проводниках. Следует отметить, что введение гиалуронидазы приводит к существенным изменениям только на 30-е сутки эксперимента: содержание пальмитоолеиновой и олеиновой увеличивается на 92% и 62% соответственно относительно серии опытов без введения

препарата. В результате этого коэффициент насыщенности снижается до 0.5, что ниже контроля на 58.3%.

С помощью метода оптического имиджинга, основанного на определении интенсивности флуоресценции, стало возможным исследовать метаболические изменения, происходящие в нервных проводниках [26, 27]. Поэтому наряду с изучением изменения жирнокислотного состава липидной фазы, данный метод может использоваться для оценки степени восстановления утраченных функций поврежденных нервов [28, 29]. В ходе данного исследования измерение флуоресценции проводилось без красителя, для этого была подобрана длина волны возбуждения, равная 465 нм; эмиссия – 515 – 575 нм. Можно предположить, что при данных длинах волн флуоресцируют флавины, содержащиеся в шванновских клетках [30]. В контрольной группе количество фотонов на единицу площади составило $2.9 \cdot 10^9$. Как видно из рисунка, нерв флуоресцирует полностью, равномерно и имеет ровные контуры (Рис. 3а). После перевязки седалищного нерва наблюдается нарушение целостности его структуры. Количество фотонов на единицу площади составило $13.3 \cdot 10^9$ и $7.9 \cdot 10^9$ через 5 и 10 суток после повреждения соответственно. Возможно, увеличение количества фотонов на 5 день после травмы происходит как за счет усиления свободнорадикальных процессов в жирнокислотной части мембраны нервного волокна, так и вследствие интенсификации электронтранспортных процессов с участием флавинов, которые также играют важную роль в процессах фотосенсибилизированного радикалообразования [31, 32]. С увеличением послеоперационных сроков до 30-ти суток наблюдается снижение количества фотонов до $3.5 \cdot 10^9$, что обусловлено развитием регенеративных процессов в седалищном нерве (Рис. 3б).

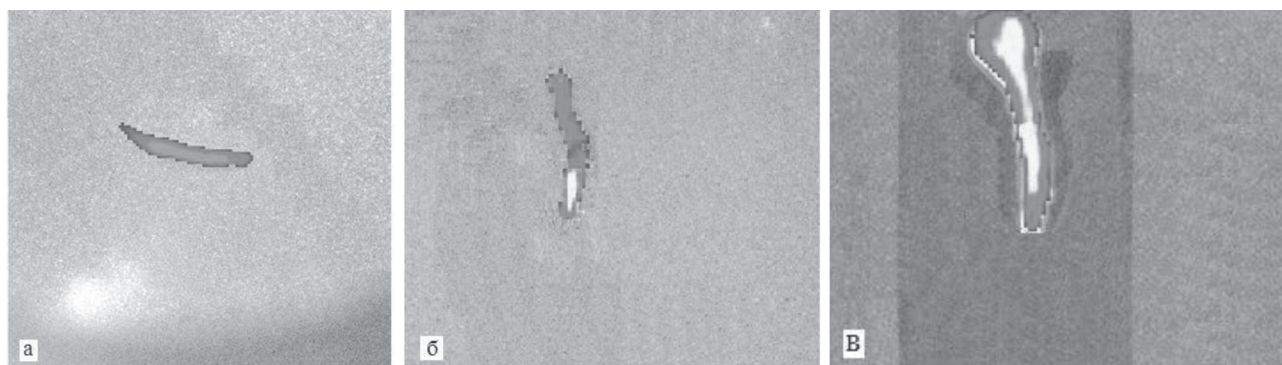


Рис. 3. Флуоресцентное изображение седалищного нерва крысы: а – в норме; б – через 30 суток после повреждения; в – через 30 суток после повреждения и введения гиалуронидазы. Параметры регистрации флуоресценции: возбуждение – 465 нм, эмиссия – 515 – 575 нм.

Это не противоречит полученным ранее данным, поскольку к 30-м суткам эксперимента отмечается нормализация жирнокислотного состава мембран поврежденного нерва. На следующем этапе нами было исследовано изменение флуоресценции травмированного нервного проводника при введении гиалуронидазы. Следует отметить наиболее выраженные изменения на 30-е сутки эксперимента: количество фотонов на единицу площади увеличилось в среднем в 2 раза по сравнению с аналогичной серией опытов без введения препарата и составило $6.4 \cdot 10^9$. При этом нерв флуоресцировал не полностью, и выявлялись участки с полным отсутствием флуоресценции (Рис. 3в).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что использование гиалуронидазы при повреждении периферических нервов приводит к изменениям в жирнокислотном составе отдельных липидных фракций. Наиболее заметные изменения наблюдаются на 30-е сутки эксперимента. Так, коэффициент насыщенности во фракциях свободных жирных кислот, диацилглицерина и общей фракции фосфолипидов снижается на 87.1, 57.1 и 45.1% соответственно относительно серии опытов с повреждением. В этих же условиях интенсивность флуоресценции возрастает в 2.2 раза, что свидетельствует об активации окислительных процессов, приводящих к усилению дегенерации нервного волокна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масгутов Р. Ф. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов / Р. Ф. Масгутов, И. И. Салафутдинов, А. А. Богов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т. VI, №3. — С. 67–70.
2. Наноструктурированный материал «Гиаматрикс» / Р. Рахматуллин [и др.] // Врач. — 2011. — №5. — С. 22–24.
3. Исследование биологической совместимости нового биоматериала «Гиаматрикс» / Р. Рахматуллин [и др.] // Врач. — 2011. — №6. — С. 32–34.
4. Деструкция хитозана в растворе под действием фермента гиалуронидазы / В. В. Чернова [и др.] // Вестник Башкирского университета. — 2009. — Т. 14, №1. — С. 44–47.
5. Гольцова Е. Н. Изучение влияния концентрации гиалуроновой кислоты на жизнеспособ-

ность моноклеарных клеток в культуре *in vitro* / Е. Н. Гольцова // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2012. — №4. — С. 26.

6. Забненкова О. В. Гиалуроновая кислота: новая эра внутридермальных наполнителей / О. В. Забненкова, А. С. Пирогова, О. Ю. Павленко // Вестник эстетической медицины. — 2009. — Т. 8, №2. — С. 83–88.

7. Особенности регенерации роговицы при применении биопластического материала на основе гиалуроновой кислоты / В. Н. Канюков [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2012. — Т. 148, №12. — С. 76–79.

8. Севастьянов В. И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия / В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2009. — Т. 11, №3. — С. 69–78.

9. Collins M. N. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review / M. N. Collins, C. Birkinshaw // Carbohydrate Polymers. — 2013. — №92. — P. 1262–1279.

10. Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration / K. Takeda [et al.] // Tissue Engineering. — 2011. — Vol. 17, №7, 8. — P. 955–965.

11. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation / S. A. Back [et al.] // Nat. Med. — 2005. — №11. — P. 966–972

12. Ревин В. В. Жирнокислотный состав индивидуальных фосфолипидов нерва краба при покое и при проведении возбуждения / В. В. Ревин, В. П. Мокринский, О. Р. Кольс // Биохимия. — 1987. — Вып. 52, № 8. — С. 1270 – 1273.

13. Ревин В. В. Поглощение Ca^{2+} при деполяризации и перерезке седалищных нервов кролика и крысы / В. В. Ревин, А. А. Московкин, О. Р. Кольс // Биологические науки. — 1992. — № 2. — С. 57 – 60.

14. Ревин В. В. Изучение активности фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С в нерве кролика в состоянии покоя и при возбуждении / В. В. Ревин, С. М. Набокина, И. А. Анисимова // Биохимия. — 1996. — Т. 61, №5. — С. 815 – 819.

15. Revin V. V. The effect of phosphoinositides on Ca^{2+} -binding ability of phosphoinositides / V. V. Revin, A. A. Moskovkin // Биофизика. — 1999. — Т. 44. № 1. — С. 57 – 58.

16. Ревин В. В. Состав липидов соматических нервов крысы при действии повреждающих факторов / В. В. Ревин, М. А. Юданов, Г. В. Максимов // Бюллетень экспериментальной биологии и

медицины. — 2006. — Т. 142, №8. — С. 155–157.

17. Роль липидов в функционировании возбужденных биологических мембран / В.В. Ревин [и др.]. — Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2012. — 220 с.

18. Hyaluronan tetrasaccharide promotes regeneration of peripheral nerve: In vivo analysis by film model method / K. Torigoe [et al.] // Brain research. — 2011. — №1385. — P. 87–92.

19. Мухина И.В. Модуляция биоэлектрической активности первичной культуры гиппокампа посредством энзиматического воздействия на внеклеточный матрикс / И.В. Мухина [и др.] // Современные технологии в медицине. — 2012. — №1. — С. 7–14.

20. Bligh E. A rapid method of total lipid extraction and purification / E. Bligh, W. Dyer // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37. — P. 911–917.

21. Биологические мембраны. Методы / Подред. Дж. Финдлея, У. Эванза — М.: Мир, 1990. — 424 с.

22. Morrison W.R. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol / W.R. Morrison, L.M. Smith // Lipid Res. — 1964. — №5. — P. 600–608.

23. Регуляция ингибирования гепарином гиалуронидазы посредством ее химической модификации / А.В. Максименко [и др.] // Биоорганическая химия. — 2000. — Т.26, №5. — С. 357–361.

24. Ингибирование дифференцировки нейрональных стволовых клеток с помощью биополимерных матриксных материалов / В.В. Кумейко [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2010. — № 2. — С. 20–26.

25. Изучение изменений содержания диацилглицерина при возбуждении нерва / В.В. Ревин [и др.] // Биохимия. — 2006. — Т.71, №10. — С. 1354–1359.

26. Fernández-Suárez M. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells / M. Fernández-Suárez, A.Y. Ting // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 9. — P. 929–943.

27. Huang B. Super-Resolution Fluorescence Microscopy / B. Huang, M. Bates, X. Zhuang // Ann. Rev. Biochem. — 2009. — Vol.78. — P. 993–1016.

28. Holthoff K. Rapid time-course of action potentials in spines and remote dendrites of mouse visual cortex neurons / K. Holthoff, D. Secevic, A. Konnerth // J Physiol. — 2010. — Vol.588. — P.1085–1096.

29. Dani A. New resolving power for light microscopy: applications to neurobiology / A. Dani, B. Huang // Curr Opin Neurobiol. — 2010. — Vol.20, №5. — P.648–652.

30. van Breugel H.H. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner / H.H. van Breugel, P.R. Bär // J. Neurocytol. — 1993. — Vol.22, №3. — P.185–190.

31. Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells / M. Eichler [et al.] // Lasers Surg Med. — 2005. — Vol. 34, №4. — P. 314–319.

32. Grzelak A. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media / A. Grzelak, B. Rychlik, G. Bartosz // Free Radic. Biol. Med. — 2001. — Vol.30, №12. — P.1418–1425.

Исакина Марина Владимировна — аспирант кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва; e-mail: mary.isakina@yandex.ru

Ревина Эльвира Сергеевна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва; e-mail: biochem_mrsu@mail.ru

Плисов Виталий Александрович — студент кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва

Ревина Надежда Викторовна — студентка медицинского института Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва

Isakina Marina V. — postgraduate student, Department of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry of the Mordovian N.P. Ogarev State University; e-mail: mary.isakina@yandex.ru

Revina Elvira S. — Assistant Professor, Ph.D., Candidate of Medicine Sciences, Department of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry of the Mordovian N.P. Ogarev State University; e-mail: biochem_mrsu@mail.ru

Plisov Vitaliy A. — student, Department of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry of the Mordovian N.P. Ogarev State University

Revina Nadezhda V. — student, Medicine faculty of the Mordovian N.P. Ogarev State University