

УДК 577.1

БЕЛКОВЫЙ АНТИОКСИДАНТНЫЙ КОМПЛЕКС ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ЛИЧИНОК *Ulomoides dermestoides*

© 2023 г. Н. А. Ушакова¹, *, О. В. Тихонова², А. В. Амбарян¹, А. И. Бастраков¹, А. Е. Донцов³

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 18.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

Получен водный экстракт из личинок жука-чернотелки *Ulomoides dermestoides*, выращенных в контролируемых условиях, и проведен его протеомный анализ на основе одномерного электрофоретического разделения белков, их трипсинолиза в геле и последующей хромато-масс-спектрометрии. Идентификацию белков проводили при помощи программы MaxQuant v.1.6.3.4. Для идентификации белков по гомологии использовали базу данных Uniprot. Каталазную активность определяли спектрофотометрически по убыли концентрации пероксида водорода. Антиоксидантную активность оценивали по тушению хемилюминесценции люминола. Экстракт содержал белки, которые могут определять биологическую активность экстракта: универсальные регуляторы клеточных процессов кальмодулин (62%), цитохром с-2 (13.5%), нуклеозиддифосфаткиназу (11.1%), ферментативные антиоксиданты супероксиддисмутазу, каталазу, глутатион S-трансферазу, пероксиредоксин, глутатионсинтазу, а также тиоредоксин, белки теплового шока 70 и 60 kDa, комплекс хитиназ (в сумме 13.4%). Активность каталазы составляла 6.3 ± 1.1 мкмоль H_2O_2 /мин/мг белка; антиоксидантная активность 1 мг белка в мл экстракта была эквивалентна 1.36 ± 0.3 мМ тролокса. Отмечена перспективность практического использования экстракта как природного антиоксидантного комплекса.

Ключевые слова: водный экстракт, белки, антиоксидант, личинки *Ulomoides dermestoides*

DOI: 10.31857/S0555109923020162, **EDN:** LVJJXJ

Антиоксиданты, благодаря их способности противодействовать свободным радикалам и нейтрализовать окислители, используются для лечения или облегчения симптомов заболеваний, связанных с действием активных форм кислорода [1, 2]. Способность организма производить антиоксиданты уменьшается с возрастом, поэтому дополнительный прием антиоксидантов важен для продления активной жизни. Большое значение уделяется поиску природных источников антиоксидантов. Насекомые рассматриваются как источник новых биологически активных веществ и являются перспективными объектами для получения новых субстанций и фармацевтического применения [3]. В практике народной медицины Китая, Японии и стран Латинской Америки известен жук-чернотелка *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae), который используется в традиционной медицине против широкого спектра болезней. Показан антидиабетический эффект, противовоспалительное действие водного экстракта жука в лабораторных опытах на модели

острого плеврита крыс; в опытах *in vitro* выявлен эффект, аналогичный действию нестероидного противовоспалительного препарата нимесулида [4–6]. Нами было показано, что водный экстракт жука *U. dermestoides* обладает защитными свойствами при введении в рацион мышей в модели ранней стадии Болезни Паркинсона [7]. Выявленный эффект мы связываем с наличием в экстракте комплекса антиоксидантных веществ белковой и небелковой природы [8]. В составе идентифицированных антиоксидантных белков жука *U. dermestoides* присутствовали супероксиддисмутаза, каталаза, вителлогенин-подобный белок, а также не белковые вещества — различные фенольные антиоксиданты, в том числе, производные гидрохинона. Важную роль в биологической активности экстракта жука могут играть и белки теплового шока, которые также содержались в этом экстракте. Однако насекомое в своем развитии проходит несколько жизненных стадий: яйцо, личинка, куколка, и жук (имаго). Личинки и жуки при массовом разведении обычно присут-

ствуют совместно в кормовом субстрате, но состав личинок и свойства их биомассы не изучены.

Целью настоящего исследования являлся анализ белкового состава водного экстракта личинок жука-чернотелки *U. dermestoides* и характеристика его антиоксидантных свойств для оценки потенциальной биологической активности полученного экстракта.

МЕТОДИКА

В работе анализировали водный экстракт из личинок *U. dermestoides* старшего возраста, длиной более 1 мм, выращенных в искусственных контролируемых условиях на сухих кормовых субстратах (смеси геркулеса и кукурузной муки). После отделения жуков или личинок от кормового субстрата просеиванием через сито с ячейкой диаметром 1.0 мм биомассу промывали, замораживали, затем гомогенизировали растиранием в холодной дистиллированной воде в холодной ступке холодным пестиком (1 : 15 вес/об.) и экстрагировали на холоду 2 сут при медленном перемешивании. Экстракты фильтровали через капроновую марлю для отделения твердых частиц и мембранный фильтр Миллипор (“Merck”, Германия) с диаметром пор 0.1 мкм для антибактериальной обработки. Хранили экстракты при -18°C .

Протеомный анализ. Для проведения исследования применяли метод протеомного анализа, который описан в работе [8], основанный на одномерном электрофоретическом разделении белков, их трипсинолизе в геле и последующей хромато-масс-спектрометрии. После разделения белков методом электрофореза в ПАГ с SDS полученную белковую дорожку разрезали на 6 фрагментов и проводили гидролиз белков трипсином в геле каждого фрагмента. Полученные пептиды анализировали при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Поскольку геном *U. dermestoides* полностью не расшифрован, идентификацию белков проводили с использованием базы данных последовательностей близкородственного организма *Tribolium castaneum* (red flour beetle).

Образец водного экстракта размораживали в течение 30 мин на водяной бане при температуре 25°C . Денатурирующий одномерный электрофорез проводили в присутствии SDS с концентрацией полиакриламида от 8 до 12% в разделяющем геле и 5% в концентрирующем геле [9]. Образец в объеме 2, 5 и 10 мкл наносили на дорожку и проводили электрофорез 60 мин при постоянном токе (18 мА). В этом случае напряжение первые 10 мин было 50 В, а с 11 до 60 мин с увеличением до 200 В. Гели фиксировали раствором уксусной кислоты и этанола (2 раза по 20 мин), а затем в течение 1 ч окрашивали раствором Кумасси и отмывали в течение

ночи. Белковую полосу, соответствующую объему 10 мкл образца, разрезали на 6 приблизительно равных фрагментов. Фрагменты геля промывали 2 раза по 15 мин 100 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония, затем высушивали 100% ацетонитрилом (15 мин), после чего раствор удаляли, а полученные образцы досушивали на центрифужном вакуумном испарителе Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия). Для гидролиза белков к каждому из 6 образцов добавляли по 50 мкл 50 мМ ТЭАБ (рН 8.5) и по 10 мкл трипсина (“Promega”, США) в концентрации 0.2 мг/мл. Смесь инкубировали в течение ночи при температуре 37°C при встряхивании 350 об./мин. Реакцию останавливали раствором 0.7%-ной трифторуксусной кислоты с последующей экстракцией 70%-ным ацетонитрилом в 0.1%-ной муравьиной кислоте. Фильтрат высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл 0.1%-ной муравьиной кислоты для последующего масс-спектрометрического анализа.

Хромато-масс-спектрометрический анализ.

Анализ пептидов осуществляли с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) с масс-спектрометром Q-exactive HFX (“Thermo Scientific”, США). Смесь пептидов (1 мкл) наносили на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0.5 $\times$ 3 мм, размер частиц 5 мкм, “Thermo Scientific”) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 4 мин в изографическом режиме с использованием буфера “С” (2%-ный ацетонитрил, 0.1%-ная муравьиная кислот в деионизованной воде) в качестве подвижной фазы. Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке Acclaim Пермар® C18 (75 мкм $\times$ 150 мм, размер частиц – 2 мкм, “Thermo Scientific”) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0.1%-ная муравьиная кислота) и Б (80%-ный ацетонитрил, 0.1%-ный водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0.3 мкл/мин. Колонку промывали 2%-ной подвижной фазой Б в течение 10 мин, после чего линейно увеличивали ее концентрацию до 35% за 43 мин, а затем до 99% за 2 мин, после 2-минутной промывки при 99%-ным буфером Б, его концентрацию линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 60 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре Q-Exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (“Thermo Scientific”, США). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ, температура капилляра 240°C . Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 до 1500 m/z при разрешении 120000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая опре-

делялась автоматически исходя из массы прекурсора, но не более 2000 m/z . Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 40, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для tandemного анализа бала установлена как 50000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для tandemного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали $1 \cdot 10^6$ и $2 \cdot 10^5$, соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из tandemного MS/MS анализа на 90 с.

Идентификация белков. Идентификацию белков экстракта личинок *U. dermestoides* проводили при помощи программы MaxQuant v.1.6.3.4 с использованием поискового алгоритма Andromeda [10], объединяя спектры, полученные для шести фрагментов геля. Для идентификации белков по гомологии использовали базу данных Uniprot с ограничением по видовой принадлежности близкородственного организма – *Tribolium castaneum*.

Были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент – трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 0.01 Да и возможность пропуска двух сайтов расщепления трипсином. Окисление метионинов, N-концевое ацетилирование белка и модификация цистеина пропионамидом были учтены как возможные модификации пептидов. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1.0%. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе iBAQ (абсолютная количественная оценка на основе интенсивности).

Функциональный анализ белков экстракта. Анализ белков экстракта личинок проводили с использованием веб-ресурса DAVID [11], загружая в качестве исходных данных все идентифицированные белки, за исключением контаминантов. Рассматривались только статистически значимые гипотезы. Для оценки статистической значимости распределения белков по группам Gene Ontology (GO) в отношении молекулярных функций применяли величину (p -value < 0.05) с поправкой на множественность сравнения Беньямини.

Антиоксидантные свойства экстракта. Предварительно в экстракте определяли содержание белка микробиуретовым методом с использованием двухлучевого спектрофотометра “Shimadzu” RF 5301PC (Япония) [12]. Каталазную активность анализировали спектрофотометрическим методом, измеряя убыль концентрации пероксида водорода по поглощению комплекса пероксида водорода с молибдатом [13].

Антиоксидантную активность (АОА) оценивали по тушению хемилюминесценции люминола. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре “Shimadzu” RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре.

Для количественной оценки способности экстракта личинки жука взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе модельной системы, результаты тушения хемилюминесценции пересчитывали в координатах зависимости латентного периода от концентрации белка в экстракте, а также по уменьшению амплитуды хемилюминесценции в присутствии экстракта. В последнем случае измеряли интенсивность хемилюминесценции в контроле, где экстракт был заменен чистым буферным раствором (I0), и в опытных образцах с различным содержанием экстракта (I), с последующим пересчетом в координатах зависимости величины $(I0/I - 1)$ от концентрации белка в экстракте. Полученные зависимости сравнивали с зависимостями амплитуды и латентного периода хемилюминесценции в присутствии тролокса (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) – водорастворимого синтетического аналога природного антиоксиданта витамина Е.

Среда для инкубации содержала: 0.05 М К-фосфатный буфер, pH 7.4, 2.0 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и различные количества экстрактов личинки жука (от 10 до 150 мкл). Реакцию начинали добавлением 100 мкМ пероксида водорода. В качестве контроля использовали буферный раствор вместо экстракта. Результаты сравнивали с действием тролокса, измеряя в тех же условиях зависимость амплитуды хемилюминесценции от концентрации тролокса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа белкового состава водного экстракта из личинок *U. dermestoides* проводили одномомерный электрофорез. На рис. 1а представлен гель после проведения электрофореза образца экстракта разных объемов 2, 5 и 10 мкл и схема разрезания дорожки, на которую нанесено 10 мкл, на 6 фрагментов геля для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Фрагменты геля вырезали из середины соответствующей белковой дорож-

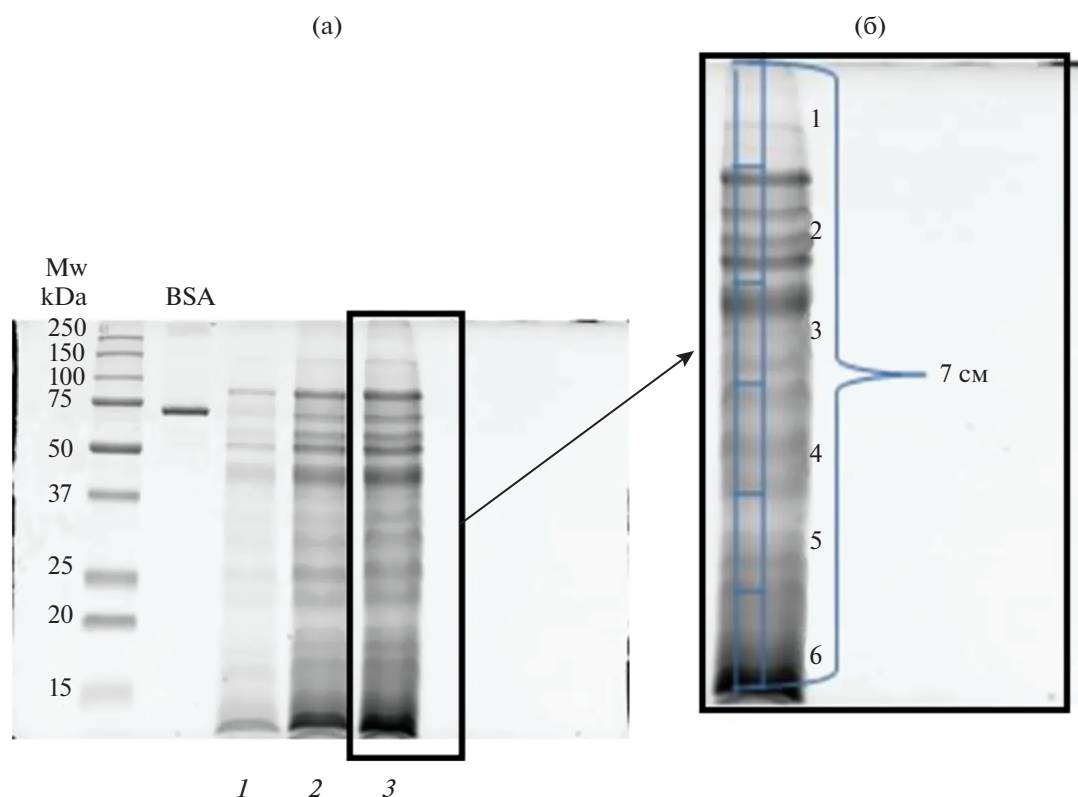


Рис. 1. Гель-электрофорез в ПААГ (а) экстракта личинок, нанесенного в разных количествах: 2 (1), 5 (2) и 10 (3) мкл; схема разделения белковой дорожки на 6 фрагментов геля для дальнейшего масс-спектрометрического анализа (б).

ки шириной около 2 мм и длиной около 10–12 мм, как схематично показано на рис. 1б.

После гидролиза трипсином в геле получали смеси пептидов для последующего ВЭЖХ-МС/МС-анализа. Для каждого вырезанного фрагмента анализ повторяли не менее двух раз. Последующую идентификацию белков экстракта проводили, объединяя все полученные спектры для 6 фрагментов геля в одном поиске. Поиск проводили по гомологии при помощи программы MaxQuant с использованием базы данных близкородственного организма. В результате масс-спектрометрического анализа в экстракте было обнаружено 169 белков и белковых групп, из которых достоверно идентифицировано 104 белка исследуемого организма, гомологичных белкам *Tribolium castaneum*. Содержание белков в экстракте оценивали при помощи эмпирического показателя iBAQ. Процентное содержание определенного белка рассчитывали, как отношение величины iBAQ белка к сумме всех величин iBAQ для всех идентифицированных белков, умноженное на 100%.

В составе идентифицированных белков в образце экстракта личинки *U. dermestoides* наиболее представленными были три белка — tr[D6WHK2|D6WHK2_TRICA Nucleoside diphosphate kinase (11.1%), tr[D6WVZ4|D6WVZ4_TRICA

Cytochrome c-2-like Protein (13.5%) и tr[D6WB91|D6WB91_TRICA Calmodulin (62%). Другие идентифицированные по гомологии белки, имеющие интерес для оценки биологической активности экстракта, представлены в табл. 1. Их суммарное содержание составило 13.4%.

В результате проведенной функциональной аннотации идентифицированных белков экстракта в терминах GO в отношении молекулярных функций была выявлена статистически значимая группа из пяти белков, обладающих антиоксидантной активностью: A0A139WLA9 (D6X4D1), D6WWA9, D2A3X3, D2A2T2, D6W9X8. Эти белки выделены в табл. 1 жирным шрифтом.

Результаты оценки антиоксидантной активности представлены на рис. 2 и 3. Каталазная активность экстракта личинок составляла 6.3 ± 1.1 мкмоль перекиси/мин мг белка.

По антиоксидантной активности 1 мг/мл белка личинок в экстракте был эквивалентен 1.36 ± 0.3 мМ тролокса. Этот результат ниже, чем АОА метанольного экстракта из жука *U. dermestoides* [4], которая составляла 3.65 ± 0.5 эквивалента тролокса. Возможно, это связано с различиями в методике экстракции (водная или метанольная), не исключено также, что при мембранной фильтрации для

Таблица 1. Некоторые идентифицированные белки и их процентное содержание в экстракте личинки *Ulomoides dermestoides*

ID, название белка (Fasta headers)	Покрытие последовательности, %	Mw, кДа	Процентное содержание, %
tr D6WFC8 D6WFC8_TRICA Glutathione S-transferase D7-like Protein	13.4	24.466	2.8
tr D2A3X3 D2A3X3_TRICA Peroxiredoxin 1-like Protein	20.4	21.778	1.5
tr D6WD04 D6WD04_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 3-like Protein	18	72.685	1.5
tr D6WWA9 D6WWA9_TRICA Superoxide dismutase OS=Tribolium castaneum	11.2	23.642	1.2
tr D6WDB4 D6WDB4_TRICA Thioredoxin-1-like Protein	37.5	15.127	0.9
tr D6WH21 D6WH21_TRICA Glutathione S-transferase S1-like Protein	11.3	23.571	0.7
tr A0A139WJ64 A0A139WJ64_TRICA Glutathione S-trans D2A2T2ferase 1-1-like Protein	13.9	24.218	0.6
tr D6W9U6 D6W9U6_TRICA Glutathione S-transferase 1-1-like Protein	13	26.753	0.5
tr D2A4J1 D2A4J1_TRICA Thioredoxin OS=Tribolium castaneum	21	11.951	0.2
tr A0A139WLA9 A0A139WLA9_TRICA; tr D6X4D1 D6X4D1_TRICA Catalase	16.6	54.648	0.2
tr A0A139WAS5 A0A139WAS5_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 4-like Protein	6.5	71.08	0.1
tr D6WCB2 D6WCB2_TRICA Heat shock 70 kDa protein cognate 2-like Protein	2.9	69.132	0.1
tr D6WKD1 D6WKD1_TRICA 60 kDa heat shock protein, mitochondrial-like Protein	22.8	61.131	0.04
tr D6WQX3 D6WQX3_TRICA Glutathione synthetase	5.3	59.487	0.03
tr D6W9X8 D6W9X8_TRICA Peroxiredoxin 1-like Protein	7	27.498	0.02
tr D6WMZ5 D6WMZ5_TRICA Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3-like Protein	5.9	60.615	0.02
tr D2A2T2 D2A2T2_TRICA Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Tribolium castaneum OX=7070 GN=SOD PE=2 SV=1	13.1	15.689	2.2
Хитиназы:			
tr Q5FYY8 Q5FYY8_TRICA Chitinase 3 tr Q5FYY7 Q5FYY7_TRICA Chitinase 16	6.2	42.032	0.42
tr Q0Z936 Q0Z936_TRICA Chitinase-like protein Idgf4	6.6	49.287	0.29
tr A8W493 A8W493_TRICA Chitin deacetylase 7	2.9	42.607	0.009
tr Q0Z940 Q0Z940_TRICA Chitinase 9	2.6	42.013	0.059

Примечание: курсивом выделены белки, которые идентифицированы по гомологии при наличии одного экспериментального пептида. Жирным шрифтом выделены белки, обладающие антиоксидантной активностью (по результатам функционального анализа).

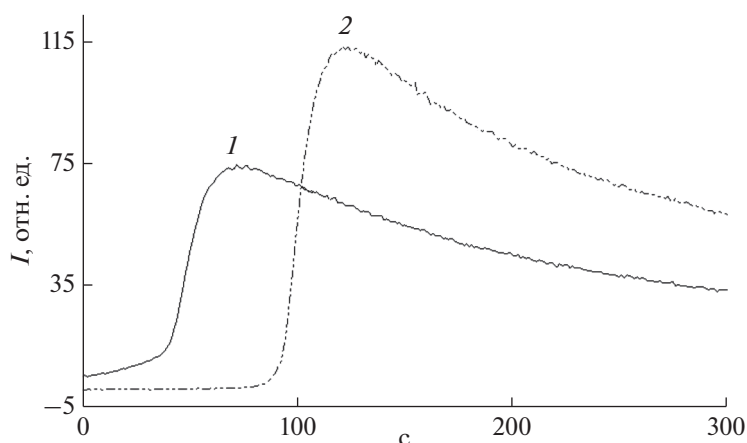


Рис. 2. Характерная кинетика возгорания и тушения хемилюминесценции люминола: 1 — экстракт личинки, 2 — тро-локс.

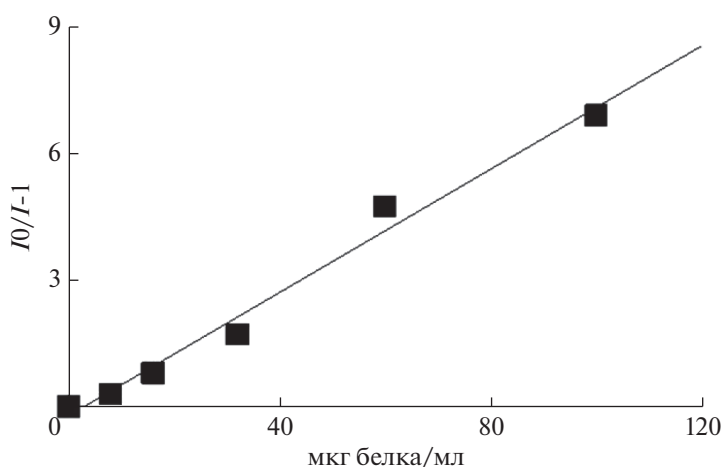


Рис. 3. Интенсивность АОА экстракта личинки в зависимости от содержания белка в экстракте.

антибактериальной обработки, были адсорбированы и некоторые активные компоненты.

Проведенный протеомный анализ водного экстракта личинок *Ulomoides dermestoides* показал присутствие широкого спектра белков, обладающих биологической активностью и использующихся в качестве лекарственных средств. Основной белок в экстракте — кальмодулин, на долю которого приходится 62% от всех выделенных белков. Это кальций-связывающий белок, обнаруживается в цитоплазме всех эукариотических клеток. Кальмодулин является универсальным регулятором многих процессов в клетке, инициирует клеточную активность. Он влияет на такие важные процессы, как воспаление, апоптоз, сокращения гладких мышц, внутриклеточный транспорт, краткосрочная и долговременная память и иммунный ответ [14, 15].

Остальные 40% протеомного экстракта практически в равных частях составляли Цитохром с-2, нуклеозиддифосфаткиназа и смесь антиоксидантных ферментов, биологически активных белков теплового шока и хитиназа.

Цитохром с-2 относится к семейству Цитохром с-типа и является гемо-содержащим белком. Выполняет важную роль при нарушениях окислительного фосфорилирования и дыхания, ингибирует перекисное окисление липидов [16]. Применяется при лечении сердечной недостаточности, рахита, анемии; восстанавливает иммунологическую активность нейтрофилов крови.

Нуклеозиддифосфаткиназа — фермент, катализирующий реакции синтеза различных нуклеозидтрифосфатов из АТФ и соответствующих нуклеозиддифосфатов, участвует в регуляции процессов подвижности клеток, злокачественного роста, апо-

птоза. Является универсальным регулятором внутриклеточных процессов [17].

В экстракте личинок выявлено присутствие белков, обладающих антиоксидантной активностью (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион S-трансфераза, пероксиредоксин, тиоредоксин), то есть основных компонентов системы, обеспечивающей антирадикальную защиту организма. Это подтвердилось антиоксидантной активностью экстракта. Относительно небольшое содержание каталазы (0.2%) в экстракте соответствовало низкой каталазной активности. Тем не менее, получена довольно высокая АОО экстракта при сравнении с активностью тролокса, что можно объяснить суммарной активностью супероксиддисмутазы, глутатионтрансферазы, пероксиредоксина и других идентифицированных в экстракте антиоксидантов.

Белки теплового шока вырабатываются клетками при стрессовых условиях в ответ на температурное воздействие, их считают белками стресса [18]. Однако белки теплового шока, такие, как hsp70, участвуют в поддержании иммунитета [19], а также играют важную роль в развитии на эмбриональных или ювенильных стадиях млекопитающих, костистых рыб и некоторых низших позвоночных [20]. Поскольку объектом настоящих исследований являлись личинки старшего возраста перед окукливанием, которые развивались в строго регламентированных условиях, обеспечивающих комфортные условия жизнедеятельности насекомых при отсутствии стресса, можно предположить, что обнаружение белков теплового шока в личинках не связано со стрессом, а служит скорее всего для обеспечения функциональной активности иммунитета.

Присутствие хитиназ является характерным признаком личинок с хитиновой наружной оболочкой, можно предположить, что это связано с периодическими линьками личинок. Личинки до образования куколок проходят несколько стадий линек. Сброшенные личинками хитиновые оболочки скапливаются на поверхности субстрата, и могут вторично использоваться личинками в процессе пищеварения за счет активности хитиназ. Хитиназы могут быть также необходимы личинкам для морфогенеза экзоскелета и/или защиты от патогенных грибов [21].

В целом можно отметить, что идентификация в водном экстракте личинок *Ulomoides dermestoides* уникального комплекса белков с потенциальной биологической активностью (регуляторными, антиоксидантными, иммуноактивными и противомикробными свойствами) открывает перспективы для практического использования экстракта.

Работа одобрена Комиссией по этике ИПЭЭ РАН №56 от 22.03.2022.

Авторы выражают благодарность Р.Л. Илиеву за консультации и ООО Натурбион за участие в получении биомассы личинок.

Протеомный анализ экстракта выполнен с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” ИБМХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suárez-Rivero J.M., Pastor-Maldonado C.J., Povea-Cabello S., Álvarez-Córdoba M., Villalón-García I., Munuera-Cabeza M. et al. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 2. P. 236.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020236>
2. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. // *Int. J. Biomed. Sci.* 2008. V. 4. № 2. P. 89–96.
3. Di Mattia C., Battista N., Sacchetti G., Serafini M. // *Frontiers in nutrition*. 2019. V. 6. P. 106.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00106>
4. Mendoza D., Salgado M., Durant L. // *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2013. V. 32. P. 402–410.
5. Deloya-Brito G.G., Deloya C. // *Acta Zoo Mex.* 2014. V. 30. P. 655–661.
6. Mendoza-Meza D.L., España-Puccini P. // *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2016. V. 19. № 2. P. 83–91.
7. Kovalzon V.M., Ambaryan A.V., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Rybalkina E.Y., Bastrakov A.I., Ushakova N.A. // *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2021. V. 12. № 10. P. 569–577.
8. Ushakova N.A., Brodsky E.S., Tikhonova O.V., Dontsov A.E., Bastrakov A.I. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. P. 1055.
<https://doi.org/10.3390/antiox10071055>
9. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970 V. 227. № 5259. P. 680–685. PMID: .
<https://doi.org/10.1038/227680a05432063>
10. Tyanova S., Temu T., Cox J. // *Nat. Protocols*. 2016. V. 11. P. 2301–2319.
11. Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T., Chang W. // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50 (W1):W216–W221.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
12. Itzhaki R.F., Gill D.M. // *Anal. Biochem.* 1964. V. 9. P. 401–416.
13. Goth L. // *Clinica Chimica Acta*. 1991. V. 196. P. 143–15.
14. Stevens F.C. // *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1983. V. 61. № 8. P. 906–910.
<https://doi.org/10.1139/o83-115>
15. Lledo P.M., Hjelmstad G.O., Mukherji S., Soderling T.R., Malenka R.C., Nicoll R.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. № 24. P. 11175–11179.
16. Ващенко В.И., Хансон К.П., Шабанов П.Д. // *Обз. клин. фарм. лек. тер.* 2005. Т. 4. № 1. С. 27–37.
17. Липская Т.Ю., Воинова В.В. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 731–741.

18. Santoro M.G. // Biochem. Pharmacol. 2000. V. 59. № 1. P. 5563.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00299-329](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00299-329)
19. Binder R.J. // J. Immunol. 2014. V. 193. № 12. P. 5765–5771.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401417>
20. Marvin M., O'Rourke D., Kurihara T., Juliano C.E., Harrison K.L., Hutson L.D. // Dev. Dyn. 2008. V. 237. № 2. P. 454–463.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21414>
21. Enzymes in Human and Animal Nutrition. Principles and Perspectives. Chapter 18 – Chitinases. //Ed. C. Simões Nunes, V. Kumar. N.Y.: Acad. Press, 2018. P. 361–378. ISBN 978-0-12-805419-2.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00018-6>

Protein Antioxidant Complex of Water Extract of Larvae of Black Beetles *Ulomoides dermestoides*

N. A. Ushakova^{a, *}, O. V. Tikhonova^b, A. V. Ambaryan^a, A. I. Bastrakov^a, and A. E. Dontsov^c

^a Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, 119071 Russia

^b Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, 119121 Russia

^c Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: naushakova@gmail.com

An aqueous extract from the larvae of black beetles *Ulomoides dermestoides* grown under controlled conditions was obtained and its proteomic analysis based on one-dimensional electrophoretic separation of proteins, their trypsinolysis in a gel and subsequent chromatography-mass spectrometry was performed. Protein identification was performed using MaxQuant v.1.6.3.4 software. The Uniprot database was used to identify proteins by homology. Catalase activity was determined spectrophotometrically by hydrogen peroxide concentration decrease. Antioxidant activity was evaluated by luminol chemiluminescence quenching. The extract contained proteins that can determine the biological activity of the extract: universal regulators of cellular processes calmodulin (62%), cytochrome c-2 (13.5%), nucleoside diphosphate kinase (11.1%), the enzymatic antioxidants superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase, peroxiredoxin, glutathione synthetase as well as thioredoxin, 70 and 60 kDa heat shock proteins, chitinase complex (13.4% in total). Catalase activity was $6.3 \pm 1.1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protein}$; antioxidant activity of 1 mg protein per ml extract was equivalent to $1.36 \pm 0.3 \text{ mM trolox}$. The prospects for practical use of the extract as a natural antioxidant complex were noted.

Keywords: water extract, proteins, antioxidant, *Ulomoides dermestoides* larvae