

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук



Сборник трудов

XIV Всероссийская молодежная школа-конференция по
актуальным проблемам химии и биологии



© ТИБОХ ДВО РАН, 2012

XIV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток 11–18 сентября 2012 г. : сборник трудов. Владивосток : ДВО РАН, 2012. – 76 с.
электронное издание

В сборнике представлены тезисы устных и стендовых докладов студентов, аспирантов и молодых ученых, участников XIV Всероссийской молодежной школы-конференции. В рефератах отражены результаты научных работ по приоритетным направлениям химии, биологии, прикладной биологии и медицины.

Для студентов, аспирантов, научных сотрудников и специалистов в области химии и биологии.

Оргкомитет молодежной школы-конференции

Председатель: советник РАН, член-корр. РАН В.Е. Васьковский

Члены оргкомитета: к.б.н. М.И. Кусайкин, к.х.н. А.М. Захаренко, к.х.н. Н.В. Агеенко, В.М. Табакмахер, к.х.н. С.А. Дышловой, А.А. Калитник, Р.В. Меньшова, к.х.н. О.С. Вищук,
А.С. Сильченко

Редакционная коллегия: В.Е. Васьковский, М.И. Кусайкин,
А.М. Захаренко, С.А. Дышловой

Утверждено к печати Ученым советом
ТИБОХ ДВО РАН

© ТИБОХ ДВО РАН, 2012

Новый прибор для сбора гидробионтов

М.В. Астахов

*Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
mvastakhov@mail.ru*

Мониторинг дрейфа гидробионтов широко используют в экологических и рыбохозяйственных исследованиях. В регионах с умеренным климатом такой мониторинг обычно не проводят зимой из-за трудностей отбора материала при температуре воздуха ниже нуля. Поэтому информация о дрейфе в покрытых льдом потоках ограничена. Согласно данным полученным в теплый сезон, дрейфующие организмы чаще являются ночными мигрантами, а их распределение в толще воды может отличаться от равномерного. Вертикальная позиция дрейфующих беспозвоночных может зависеть от времени 24-часового цикла. В случае загрязнения интенсивность дрейфа возрастает [1]. Поскольку многие донные гидробионты способны контролировать своё положение в водной толще, то можно полагать, что такие организмы, избегая загрязненные участки, будут чаще, чем при нормальных условиях, формировать большую плотность в поверхностном слое. Для проверки этой гипотезы актуально использование специализированных пробоотборников. Один из таких пробоотборников сконструирован автором настоящего сообщения. Прибор предназначен для дифференцированного отбора материала из разных слоев водной толщи во все сезоны года.

Применение пробоотборника позволило получить данные, демонстрирующие вертикальную неоднородность в распределении дрейфующих гидробионтов при глубине потока всего в 0.3 м. Результаты показали, что вертикальная стратификация сиртона – явление не стабильное и имеет дневные и ночные сдвиги. Типичная модель активности в дрейфе (общая численность дрейфтеров выше в ночное время) наблюдалась в безморозный период. С наступлением периода ледостава возростала роль дневных дрейфтеров.

Главное достоинство нового устройства – оригинальный способ присоединения сменных сачков, позволяющий улучшить производительность, что важно при работе без ассистентов. Техника использования нового устройства имеет ещё одно преимущество перед методами, при которых сачки монтируются на вбитые в дно стойки, или на заякоренные тяжелые конструкции. Эти методы надежны, однако не всегда удобны, поскольку требуют предварительной подготовки места отбора материала; последнее отнимает много времени и ограничивает мобильность исследователя. Применение нового пробоотборника не требует такой подготовки. Прибор имеет малую массу (вместе с пятью установленными сачками – менее 0.4 кг) и легко транспортируется в готовом для работы состоянии. Это позволяет быстро реагировать на изменение внешних условий (например, внезапный подъем уровня воды); лучше контролировать процесс отбора проб; отбирать материал свободно перемещаясь по речному руслу в случае исследования пространственного распределения дрейфующих гидробионтов.

1. Beketov M.A., Liess M. // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2008, 55, 247-253.

Исследование состава хиноидных пигментов морских ежей с использованием высоко-эффективной жидкостной хроматографии LCMS

А.И. Ахмерова*, Н.П. Мищенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

* akhaigyul@mail.ru

Полигидроксиллированные хиноидные пигменты морских ежей обладают широким спектром биологической активности. На основе эхинохрома А, распространенного пигмента морских ежей, в ТИБОХ ДВО РАН разработано новое лекарственное средство «ГИСТОХРОМ», которое в настоящее время используется в кардиологии для лечения ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и в офтальмологии для лечения дегенеративных и воспалительных заболеваний роговицы, сосудистой и сетчатой оболочек глаза [1]. В связи с этим особую актуальность приобретает развитие быстрых и надежных методов анализа экстрактов, полученных из природных объектов.

Идентификацию и определение количественного содержания хиноидных соединений в хлороформных и этилацетатных экстрактах морских ежей проводили методом хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Shimadzu LCMS–2020. Исследуемые вещества сравнивали по времени удерживания, УФ- и масс – спектрам с аналогичными параметрами стандартных образцов. В качестве стандартных образцов использовали эхинохром А, спинохромы А, В, С, D, Е, эхинамины А и В, бинафтохинон мирабихинон С и его ангидропроизводное мирабихинон В и другие полигидроксинафтохиноны, выделенные или синтезированные в ЛХПХС ТИБОХ ДВО РАН [2]. Используя LCMS данные для каждого соединения из созданной библиотеки, было проведено исследование химического состава хиноидных пигментов нескольких видов морских ежей Южно-Китайского моря: *Tripneustes gratilla* (Linnaeus, 1758), *Diadema setosum* (Leske, 1778), *Echinothrix calamaris* (Pallas, 1774), *Laganum depressum* (Agassiz, 1841).

Анализ экстрактов морских ежей показал, что самыми богатыми источниками эхинохрома А являются морские ежи *Diadema setosum* и *Echinothrix calamaris*, в которых его содержание достигает 0,05% от массы сырья. В хлороформных экстрактах из этих ежей содержание эхинохрома А доходит до 70% от суммы пигментов. Самым распространенным пигментом является спинохром D, обнаруженный во всех исследованных видах. Его содержание колеблется от 5 до 40% от суммы пигментов. Наибольшее его количество обнаружено в морском еже *Laganum depressum*. Спинохром Е составлял 70 и 20%, соответственно, из суммы пигментов морских ежей *Tripneustes gratilla* и *Echinothrix calamaris*.

Кроме структурно известных хиноидных пигментов в экстрактах исследованных морских ежей *Echinothrix calamaris*, *Tripneustes gratilla*, *Laganum depressum* обнаружены не идентифицированные хиноидные соединения, представляющие интерес для дальнейших исследований пигментов морских ежей.

1. Н.П. Мищенко, С.А. Федореев, В.Л. Багирова // *Хим.- фарм. журн.* 2003. Т. 37. С. 49-53.
2. N.P. Mischenko, S.A. Fedoreyev, N.D. Pokhilo, V.P. Anufriev, V.A. Denisenko, V.P. Glazunov // *J. Nat. Prod.* 2005, V.68, P. 1390–1393

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №04-03-96042) и Программы Президиума ДВО РАН «Фундаментальные науки медицине» (12-I- P5-04).

Установление структуры полноразмерной кДНК эндо-1,3-β-D-глюканазы из морского моллюска *Lambis sp.*

А.А. Белик*, С.Н. Ковальчук

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН,
Владивосток, Россия

*belik_a_a@mail.ru

Семейство 16 гликозидгидролаз (GH-16) является одним из самых полиспецифичных, так как объединяет ферменты, способные катализировать гидролиз целого спектра углеводов. При этом эндо-1,3-β-D-глюканазы морского происхождения, в частности морских моллюсков, наименее изучены. Отличительной чертой эндо-1,3-β-D-глюканаз морских моллюсков по сравнению с гликозидгидролазами из наземных источников (лизоцимами, альфа-амилазами, целлюлазами и т.д.) является их повышенная способность к трансгликозилированию, в результате которой в продуктах реакции обнаруживается набор олигозидов, «меченных» по восстанавливающему концу остатком молекулы акцептора [1]. На этом свойстве эндо-1,3-β-D-глюканаз морских моллюсков основано их практическое использование для получения биологически активных 1,3- или смешанных 1,3;1,4- и 1,3;1,6-β-D-глюканов, обладающих иммуномодулирующими свойствами [2]. На сегодняшний день установлены аминокислотные последовательности эндо-1,3-β-D-глюканаз из 9 видов моллюсков. Исследование структурно-функциональных особенностей эндо-1,3-β-D-глюканазы из морского моллюска *Lambis sp.* в сравнении с эндо-1,3-β-D-глюканазами из других видов морских моллюсков поможет установить связь между структурой и свойствами ферментов этого семейства гликозидгидролаз.

На данный момент выполнена работа по установлению структуры кДНК, кодирующей данный фермент, и начата работа по его выделению. Установление первичной структуры эндо-1,3-β-D-глюканазы было проведено методом клонирования и секвенирования кДНК, кодирующей данный фермент. На сегодняшний день это наиболее эффективный подход для установления аминокислотной последовательности эукариотических белков. На первом этапе выделили суммарную РНК из гепатопанкреаса *Lambis sp.* На втором этапе с полученной РНК была синтезирована первая цепь кДНК, которая затем была амплифицирована методом ПЦР. Для амплификации фрагментов кДНК были использованы вырожденные олигонуклеотидные праймеры, созданные на основе анализа консервативных участков аминокислотных последовательностей известных эндо-1,3-β-D-глюканаз. В результате ПЦР были получены фрагменты кДНК длиной около 400 п.н. На основе установленной нуклеотидной последовательности внутреннего фрагмента кДНК были сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации концевых фрагментов кДНК. Амплификацию проводили с использованием метода RACE (rapid amplification of cDNA ends). Таким образом, нами была установлена нуклеотидная последовательность полноразмерной кДНК эндо-1,3-β-D-глюканазы *Lambis sp.* Она имеет длину 1781 п.н. и кодирует полипептидную цепь длиной 459 а.о.

1. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. Механизм действия и специфичность эндо-1,3-β-D-глюканаз морских моллюсков // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20, №5. С. 453-473.
2. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В. Ферментативное превращение ламинаранов в 1,3;1,6-β-D-глюканы, обладающие иммуностимулирующей активностью // Биоорганич. химия. 1995. Т. 21. С. 218-225.

Исследование влияния температуры на экспрессию генов неспецифических поринов *Yersinia pseudotuberculosis*

Е.П. Быстрицкая*, А.М. Стенкова, А.Н. Пирко, М.П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, Дальневосточное отделение РАН

*belyjane@gmail.com

Бактерия *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудитель псевдотуберкулеза чрезвычайно широко встречается в природе и обладает уникальными адаптационными возможностями. Она живет и размножается как во внешней среде, так и в теплокровном организме, сочетая сапрофитный и паразитический образ жизни [1]. Механизмы адаптации данной бактерии к различным хозяевам и различным условиям окружающей среды изучены недостаточно. Известно, что порины – класс неспецифических порообразующих белков – играют огромную роль в адаптации бактерий, обеспечивая контролируемую проницаемость наружной мембраны для низкомолекулярных соединений, в том числе питательных веществ, метаболитов, токсинов и антибиотиков [2, 3]. Исследование влияния факторов внешней среды на экспрессию поринов позволит понять особенности жизнедеятельности патогенной для человека *Y. pseudotuberculosis*, а также других психрофильных микроорганизмов и выяснить механизмы их адаптации к изменяющимся условиям.

Данная работа была посвящена изучению влияния температуры на экспрессию генов неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Для этого изначально была выполнена оптимизация условий ПЦР для трёх генов неспецифических поринов (*ompF*, *ompC* и *ompY*) и двух референсных генов (16S rDNA и *gyrB*) *Y. pseudotuberculosis*. Для всех изученных генов были построены калибровочные кривые, определены эффективность реакции и коэффициенты корреляции. В качестве референсного гена был выбран *gyrB* ген. Для исследования влияния температуры на экспрессию поринов бактериальные культуры наращивали в LB среде с аэрацией при 37°C и 4°C. Для выделения РНК отбирали культуру в логарифмической фазе роста (OD₆₀₀=0,5). В дальнейшем образцы использовали в последовательных постановках ПЦР в режиме реального времени в оптимальных условиях для каждой пары праймеров. Для расчёта разницы в экспрессии использовали метод $\Delta\Delta Ct$. Эксперимент для каждого образца ПЦР проводили в трёх повторях. В качестве референсного гена использовали *gyrB* ген, за контрольные условия принимали температуру 37°C. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что температура оказывает существенное влияние на уровень экспрессии неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis*. Причём в холодных условиях (4°C) значительно возрастает экспрессия OmpF порина, характеризующегося большим размером поры, и понижается экспрессия OmpC и OmpY поринов с меньшим размером поры. Таким образом, нами впервые было показано, что OmpF, OmpC и OmpY порины *Y. pseudotuberculosis* принимают участие в термоадаптации бактерии.

1. Новикова О. Д., Хоменко В. А., Емельяненко В. И., Лихацкая Г. Н., Зелепуга Е. А., Ким Н. Ю., Исаева М. П., О. Ю. Портнягина, О. П. Вострикова, Т. Ф. Соловьева // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 1. С. 1-16.
2. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. // Вестник ДВО РАН. 2004. № 3. С. 35-44.
3. Nikaido H. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. N. 4. P. 593-656.

Антрахиноидные пигменты корней растения *Rubia jesoensis*

Е.А. Васильева^{1*}, А.П. Шолох¹, Н.П. Мищенко²

¹Дальневосточный федеральный университет, кафедра биоорганической химии и биотехнологий,
²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточное отделение РАН,
г. Владивосток, Россия
* flame_9850@mail.ru

Род *Rubia* (марена) включает в себя более 60 видов растений, многие из которых встречаются в различных регионах Европы, Азии, Африки и Америки. Лишь 25% из этих растений фитохимически исследованы [1]. Соединения, выделенные из мареновых, обладают противоопухолевой активностью, противовоспалительными, антисептическими, антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами. Антрахиноны *R. cordifolia* и *R. tinctorum* используются для лечения мочекаменной болезни [2,3]. Состав антрахинонов *Rubia jesoensis* (Miyabe et Miyake), произрастающей на юге Приморского края, до настоящего времени не был изучен.

Из экстрактов корней *R. jesoensis* методами колоночной хроматографии были выделены и идентифицированы 11 антрахинонов. Спиртовой экстракт содержал примверозиды ализарина (1), рубиадина (2) и луцидина (3), а хлороформный - ализарин (4), пурпурин (5) и нордамнакантал (6). Структуры выделенных соединений определены методами ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии с использованием COSY, HSQC и HMBC экспериментов. Для анализа смеси антрахинонов 7 и 8, близких по хроматографическим свойствам, получены продукты их метилирования диазометаном, которые были идентифицированы методом хроматомасс-спектрометрии на приборе Shimadzu LCMS – 2020. Метилловые эфиры 9 и 10 этих антрахинонов были успешно разделены при помощи гель-хроматографии на сефадексе LH-20, а их структуры установлены методами ЯМР-спектроскопии как 1,4-дигидрокси-3-метокси-2-карбометокси-9,10-антрахинон (9) и 4-гидрокси-1,3-диметокси-2-карбометокси-9,10-антрахинон (10). Таким образом установлено, что в корнях *R. jesoensis* содержатся псевдопурпурин (7) и его природное метоксильное производное (8), сведений о котором в литературе не обнаружено.

Показано, что в процессе выделения муньистина легко происходит его этилфикация в спиртовых растворах с образованием его этилового эфира 11.

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	OH	O-β-D-Glu-(1-6)-β-D-Xyl	H	H
2	OH	CH ₃	O-β-D-Glu-(1-6)-β-D-Xyl	H
3	OH	CH ₂ OH	O-β-D-Glu-(1-6)-β-D-Xyl	H
4	OH	OH	H	H
5	OH	OH	H	OH
6	OH	CHO	OH	H
7	OH	COOH	OH	OH
8	OCH ₃	COOH	OH	OH
9	OH	COOCH ₃	OCH ₃	OH
10	OCH ₃	COOCH ₃	OCH ₃	OH
11	OH	COOC ₂ H ₅	OH	H

Определены антирадикальная способность выделенных соединений взаимодействовать с дифенилпикрилгидразилом и цитотоксическая активность на опухолевых клетках.

1. Ram Singh, Geetanjali, S.M.S. Chauhan // Chemistry & Biodiversity. **2004**. V. 1. – P. 1241-1264.
2. Н.П. Мищенко, С.А. Федореев, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов, О.В. Азарова, Ю.Н. Шкрыль, Г.К. Чернодед // Хим.-фарм. журн. **2007**. Т. 41, N11. – С. 38-41.
3. Meei-Jen Liou, Pei-Lin Wu, Tian-Shung Wu // Chem. Pharm. Bull. **2002**. V. 50, N. 2. – P. 276-279.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №04-03-96042) и Программы Президиума ДВО РАН «Фундаментальные науки медицине» (12-I- P5-04).

Противоопухолевая активность и молекулярный механизм действия фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*

О.С. Вищук*, С.П. Ермакова, Т.Н. Звягинцева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*vishchuk@mail.ru

Проблема химиотерапии онкологических заболеваний, несмотря на значительные успехи в последние годы, является актуальной. На современном этапе развития медицины перспективным направлением лечения злокачественных новообразований является поиск и разработка нетоксичных противоопухолевых препаратов на основе субстанций природного происхождения. Низкая токсичность полисахаридов бурых водорослей, разнообразная биологическая активность, экологически чистые и экономичные технологии их производства привлекают внимание многих исследователей.

Целью данной работы явилось изучение противоопухолевой активности 1→3; 1→4- α -L-фукана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и установление молекулярного механизма его действия.

Установлено, что фукоидан из *F. evanescens* не обладал цитотоксической активностью по отношению к нормальным эпидермальным клеткам мыши JB6 C141 в концентрациях до 400 мкг/мл и проявлял избирательность действия на пролиферацию различных типов опухолевых клеток человека (Рис. 1).

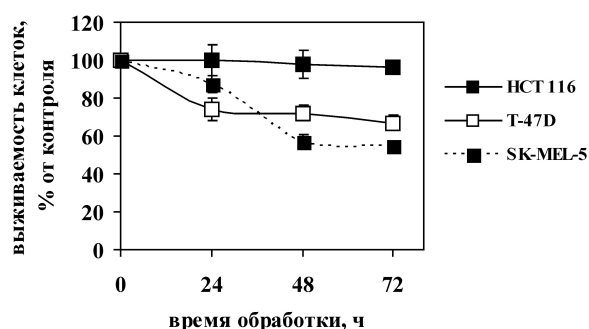


Рисунок 1 – Выживаемость опухолевых клеток человека, обработанных фукоиданом из *F. evanescens*

Показано, что фукоидан из *F. evanescens* обладал наиболее выраженным ингибирующим действием на формирование и рост клеток меланомы человека SK-MEL-5 (Рис. 2).

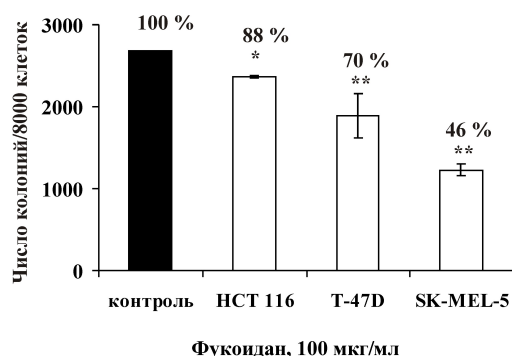


Рисунок 2 – Действие фукоидана из *F. evanescens* на формирование и рост колоний опухолевых клеток человека

Установлено, что молекулярный механизм противоопухолевого действия фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* связан с подавлением УФ-индуцированной экспрессии матричной металлопротеиназы-1, мРНК и митоген активируемых протеинкиназ ERK 1/2, JNK 1/2 и p38. Таким образом, фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* может быть потенциальным терапевтическим средством для предотвращения возникновения меланомы кожи под действием УФ-облучения и использоваться как активная составляющая в лечебной и лечебно-профилактической косметике.

Реологические свойства геля хитозан-каррагинан

А. В. Володько*, В. Н. Давыдова, И. М. Ермак

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

**morskaia@list.ru*

Гели представляют широчайший спектр самых разнообразных функциональных материалов, занимающих промежуточное положение между жидкостями и твердыми телами. В последнее время большое внимание привлекают материалы на основе биополимеров, которые отличаются от синтетических отсутствием токсичности и биосовместимостью с живыми системами. Такие гелевые системы находят самое широкое применение в пищевой промышленности, фармакологии, косметике, биотехнологии и биоинженерии. Кроме того, они лежат в основе многих тканей и жидкостей в живом организме. Гели на основе полиионных полисахаридов - кррагинана и хитозана могут представлять особый интерес, благодаря разнообразным биологическим свойствам исходных полимеров.

Ранее нами был изучен процесс формирования растворимых комплексов хитозан-каррагинан и установлена его зависимость от структуры исходных компонентов, их концентрации, и соотношения. Наибольшее связывание компонентов с образованием растворимых полиэлектролитных комплексов (ПЭК) наблюдалось при уменьшении молекулярного веса и степени ацетелирования хитозана, а также увеличении содержания сульфатных групп каррагинана.

Целью данной работы является подбор условий формирования гелевой формы ПЭК хитозан-каррагинан и изучение их реологических характеристик. В работе были использованы хитозан с молекулярной массой 70 кДа и различные образцы каррагинанов - каппа-, икс- каррагинаны, а также смесь каппа- и лямбда-каррагинанов (к-λ-каррагинан). Показано, что фазовое состояние и плотность геля определяются способом его получения, последовательностью смешения исходных компонентов, их концентрацией и соотношением.

Изучены реологические свойства полученных гелей и их составных компонентов. Установлено, что реологические свойства используемых в работе каррагинанов зависят от количества и местоположения сульфатных групп в дисахаридном звене полисахарида. Зависимость динамической вязкости и напряжения сдвига от скорости сдвига не наблюдалось для каппа- и икс-каррагинанов ($C = 10$ мг/мл), тогда как добавление КС1 к раствору каппа-каррагинана приводило к увеличению вязкости. В последнем случае система представляла собой неньютоновскую псевдопластичную жидкость. В то же время поведение к-λ-каррагинана было характерно для неньютоновской псевдопластичной жидкости в отсутствии КС1.

Добавление к к-λ-каррагинану хитозана приводило к значительному увеличению вязкости системы, которая также представляла собой неньютоновскую псевдопластичную жидкость. Наблюдаемое изменение вязкости во времени при постоянной скорости сдвига для комплекса к-λ-каррагинан/хитозана может быть результатом межмолекулярного взаимодействия в полимерной цепи вследствие образования комплекса. Подобного эффекта не наблюдалось для каппы- и икс-каррагинанов с хитозаном.

Популяционно-генетическая структура эстуарных корбикул Приморья (*Bivalvia*, *Cyrenidae*) определяется наличием обмена генов между популяциями

Н.О. Вороной^{1*}, Н.И. Заславская^{2,3}, М.Ю. Баркина⁴

¹Дальневосточный Федеральный университет, Школа естественных наук, Кафедра биоразнообразия и морских биоресурсов, г. Владивосток, Россия

²Дальневосточный Федеральный университет, Школа естественных наук, Кафедра клеточной биологии и генетики, г. Владивосток, Россия

³Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, лаборатория генетики, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

⁴Дальневосточный Федеральный университет, Школа естественных наук, Кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии, г. Владивосток, Россия

*voronoy_n@mail.ru

Двустворчатые моллюски рода *Corbicula* (корбикулы) представляют собой группу небольших по размерам солоновато- и пресноводных моллюсков, широко распространенных по всему миру. Благодаря своей пищевой и лекарственной ценности, эти моллюски являются важными промысловыми объектами. Среди промысловых двустворчатых моллюсков юга Дальнего Востока, японская корбикула – *C. japonica* Prime является единственным солоноватоводным видом, образующим крупные скопления в эстуариях, лиманах, лагунах, соленых озерах, опресненных бухтах и заливах.

Материалом для данной работы послужили сборы корбикул из 10 эстуарных водоемов Приморского края. Размер каждой выборки составлял 70-120 образцов. При помощи горизонтального электрофореза исследовалась аллозимная изменчивость по 9 полиморфным локусам (эстераза=*Est*, маннозо-6-фосфат изомераза=*Mpi*, малат дегидрогеназа=*Mdh*, лейцинаминопептидаза=*Lap*, 6-фосфоглюконат дегидрогеназа=*6-Pgd*, β-галактозидаза=*Gal*, аргининфосфат киназа=*Argk*, изоцитрат дегидрогеназа=*Idh*, глюкозо-6-фосфат изомераза=*Gpi*).

Во всех выборках наблюдается соответствие наблюдаемых частот аллелей ожидаемым из уравнения Харди-Вайнберга, за исключением озерных популяций (оз. Пресное по локусу *Gal*: $p < 0,01$; оз. Мраморное по локусам *Gal*: $p < 0,01$ и *Mpi*: $p < 0,01$; оз. Круглое по локусам *Idh*: $p < 0,01$ и *Gal*: $p < 0,01$). Это несоответствие выражалось в дефиците гетерозигот, что может быть обусловлено эффектом Валунда.

Генетический профиль всех популяций, по частотам наиболее часто встречающихся аллелей, также заметно отличается, за исключением 3х пар водоемов, связанных между собой. В то же время, показатели генетического сходства *I* (Nei, 1972) свидетельствуют о том, что все популяции представлены одним видом (*I* варьировало от 0,916 до 0,994). Об этом же свидетельствует тот факт, что ни в одной популяции не было обнаружено неравновесие по сцеплению ни по одной паре локусов.

Таким образом, популяционно-генетическая структура *C. japonica* определяется в первую очередь возможностью обмена генами между поселениями. Там, где такой обмен возможен (лагуна Лебяжья, сообщающиеся озера Духовское и Мраморное), различия между поселениями статистически несущественны. Все остальные поселения являются уникальными по генетическому составу. Расселение *C. japonica*, по всей вероятности, происходило в направлении с юга на север, о чем свидетельствует падение гетерозиготности в северных популяциях.

Работа выполнена при поддержке грантов № 11.G34.31.0010 и № 02.740.11.0678.

Физико-химическое исследование ацетилацетонатов дифторида бора

Н.А. Гельфанд*, И.В. Свистунова, В.И. Разов, Н.П. Шапкин
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
* gelfand_nataliya@mail.ru

Временная позитронная аннигиляционная спектроскопия – ядерно-физический метод исследования вещества, основанный на изучении особенностей аннигиляции позитронов и образования атомов позитрония. Аннигиляция - это превращение частицы и соответствующей ей античастицы в гамма-излучение или другие частицы. Позитроний – простейший водородоподобный атом, состоящий из электрона и позитрона.

Ранее было показано, что методом позитронной аннигиляционной спектроскопии можно исследовать распределение электронной плотности в сложных молекулярных структурах. Данный метод был применен для изучения ацетилацетонатов некоторых трехвалентных металлов и их γ -замещенных производных, в результате чего был сделан вывод о возможности применения позитронной диагностики для качественной оценки электронного влияния заместителей в γ -замещенных β -дикетонах металлов [1]. Также было изучено влияние структуры металлохелата на такие параметры как время жизни и интенсивность аннигиляции позитрона в ацетилацетонатах двухвалентных металлов и их γ -замещенных производных [2].

В данной работе методом временной позитронной аннигиляционной спектроскопии были исследованы ацетилацетонат дифторида бора и его γ -хлор-, бромзамещенные производные. В результате было проанализировано влияние γ -заместителя на время жизни и интенсивность аннигиляции позитронов и позитрония. Была проведена корреляция данных позитронной диагностики с данными рентгеноструктурного анализа и квантовохимического расчета.

Согласно результатам расчета в исследуемых ацетилацетонатных комплексах численное значение заряда на атоме γ -углерода заметно уменьшается в ряду $F_2BAsAcH$ - $F_2BAsAcCl$ - $F_2BAsAcBr$. Это согласуется с изменением интенсивности аннигиляции позитрона. Также выявлена следующая зависимость: с увеличением удельного объема ловушки позитрона интенсивность аннигиляции понижается.

Полученные данные позволили сделать вывод о механизме взаимодействия позитронов с молекулами исследуемых комплексов: главным центром аннигиляции в этих соединениях является γ -углерод хелатного кольца, а взаимодействие с позитроном происходит по схеме реакции диссоциативного захвата позитрона [1].

Было обнаружено, что объемная доля ловушки позитрония возрастает с увеличением объема межмолекулярного пространства в ряду $F_2BAsAcH$ - $F_2BAsAcBr$ - $F_2BAsAcCl$. Аналогичная зависимость наблюдается и для времени жизни, интенсивности аннигиляции и константы скорости аннигиляции позитрония. Низкое значение интенсивности аннигиляции позитрония объяснено ингибированием атомами фтора образования позитрония [3].

В результате проделанной работы было показано, что основным фактором, определяющим аннигиляцию позитрона, является заряд на γ -углероде хелатного кольца. Кроме того, показана возможность использования сравнительного метода определения межмолекулярного объема для кристаллических веществ, найдена зависимость аннигиляции позитрона и позитрония в ацетилацетонатах дифторида бора как от электронных, так и от пространственных параметров данных соединений.

1. Шапкин, Н.П. и др. // Коорд. химия. 2003, 8, 590-594
2. Шапкин, Н.П. и др. // Коорд. химия. 2006, 5, 374-378
3. Marques-Netto, A. et al. // Chemical Physics Letters. 2001, 333, 371-374

Создание химерного гена *ompF::turboGFP* для и экспрессии в раковых клетках человека

Н.В. Гончаров^{1*}, И.С. Гулян², Д.В. Невожай³, М.П. Исаева^{1,3}

¹ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

² Владивостокский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, г. Владивосток, Россия

* *nickolass_92@mail.ru*

Одним из возможных методов генной терапии онкологических заболеваний является введение в опухолевые клетки генов, кодирующих белки, которые могут вызвать иммунный ответ со стороны организма пациента. Достаточно мощный индуцированный иммунный ответ в этом случае не только вызвал бы частичное разрушение опухоли иммунной системой, но и также облегчил бы распознавание опухолевых антигенов и развитие дальнейшего специфического противоопухолевого иммунного ответа.

Белки порины экспрессируются в прокариотах и функционируют как поры, регулируя проницаемость наружной мембраны бактерий. Ранее было показано, что порины участвуют в процессах взаимодействия патогенного микроорганизма и хозяина, включая адгезию и инвазию [1], а также обладают антигенными свойствами, индуцируя ответ иммунной системы хозяина [2]. В- и Т-клеточные эпитопы поринов локализованы во внешних петлях молекулы и β -стрендах. Антитела к соответствующим поринам обнаруживаются в сыворотках больных, инфицированных данным возбудителем.

Мы предположили, что порин OmpF бактерии *Y. pseudotuberculosis* [3] может использоваться как белок, вызывающий иммунный ответ после введения его в клетки опухоли. Целью этой работы была оптимизация экспрессии *ompF* в клетках млекопитающих и исследование клеточной локализации белка, что является необходимым подготовительным этапом перед исследованием иммуногенности этого белка в *in vivo* опухолевых моделях на мышах.

В ходе исследования, методами молекулярной биологии, мы создали химерный ген, состоящий из *ompF* и *turboGFP* [4]. Репортерный ген *turboGFP* был введен для оценки эффективности экспрессии *ompF* гена, а также установления локализации его продукта в клетке [5]. Химерный ген *ompF::turboGFP* был помещен под контроль промотора цитомегаловируса (CMV), высокоактивного в клетках млекопитающих [6], и соответствующая плаزمиды была ведена в геном клеточной линии человека HeLa. После селекции и отбора клональных популяций клеток, экспрессирующих новый ген, нами была оценена эффективность экспрессии химерного гена с помощью проточной цитометрии, а также внутриклеточная локализация белка с помощью флуоресцентной микроскопии.

1. Sidorov, V.V.; Vischuk, O.S. // Carbohydr. Chem. 2010, 20, P. 222-225.
2. van Putten J.P., Duensing T.D., Carlson // J. Med. 1998, 188(5), P. 941-52.
3. Singh M., Ganguly N.K., Kumar L. // Microbiol. Immunol. 1999, 43(6). P. 535-42.
4. Portnyagina O., Sidorova O., Issaeva M. Croatia. 2012. Chap. 15. P. 243-258.
5. Shagin DA, Barsova EV, Yanushevich YG. Mol. Biol. Evol. 2004, 21(5). P. 841-50.
6. Nevozhay D., Adams R.M., Murphy K.F. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009, 106(13). P. 5123-8.
7. Boshart M., Weber F., Jahn G. // Cell. 1985, 41(2), P. 521-30.

Исследование молекулярных механизмов действия ааптамина, деметилоксиааптамина и изоааптамина на цисплатин-резистентных опухолевых клетках

С.А. Дышловой^{1,2*}, И. Неац², З. Фенц³, С.Н. Фёдоров¹, Л.К. Шубина¹, В.А. Стоник¹, Ш. Балабанов², Ф. Хонекер²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

²Клиника Эппендорф при университете Гамбурга, г. Гамбург, Германия

³Университет Грайфсвальда, г. Грайфсвальд, Германия

* dishlovoy@mail.ru

Морские губки являются богатым источником низкомолекулярных природных соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью. В продолжение изучения ааптаминов – биологически-активных метаболитов морских губок – мы исследовали алкалоид ааптамин (**1**) и два его природных производных, деметилоксиааптамин (**2**) и изоааптамин (**3**), выделенные ранее из морской губки *Aaptos* sp. и обладающие противоопухолевой активностью, реализующейся через малоизученный механизм действия.

Нами было показано, что вещества **1**, **2** и **3** обладают одинаковой цитотоксической активностью как по отношению как к лекарственно-чувствительным (NT2), так и лекарственно-устойчивым (NT2-R) клеткам эмбриокарциномы человека.

Исследование эффекта веществ в концентрациях IC₅₀ на цисплатин-устойчивые NT2-R клетки выявило способность ааптамина ингибировать пролиферацию без заметного влияния на жизнеспособность клеток, в то время как деметилоксиааптамин и изоааптамин индуцировали апоптоз.

Для идентификации белков, являющихся прямыми или косвенными мишенями алкалоидов **1-3** в клетках NT2-R, нами был применён метод протеомики. Обработка клеток веществами **1**, **2** и **3** в концентрации IC₅₀ в течение 48 часов привела к изменениям, зафиксированным для 22, 16 или 17 белков соответственно. Изменения, происходящие с некоторыми из идентифицированных белков, были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга. Наблюдаемые процессы были вызваны скорее пост-транскрипционными модификациями, чем изменениями в общем уровне экспрессии белка. Так, обработка клеток ааптамином (**1**) приводила к гипузинированию белка eIF5A (образованию аминокислоты гипузина из лизина⁵⁰), фосфорилированию кофилина-1 и дефосфорилированию виментина. Обработка клеток деметилоксиааптамином (**2**) приводила к регуляции шаперона Hsp70, а также фосфорилированных форм альфа-энолазы. Изоааптамин (**3**) вызывал диссоциацию внутриядерного комплекса белка нуклеолина с гистоном H1. Примечательно, что вещества **2** и **3**, в отличие от **1**, не вызывали гипузинирования белка eIF5A.

Гипотетический анализ путей реализации анипролиферативного/цитотоксического эффекта проводился с помощью программы IPA на основании анализа взаимодействий, выявленных методом протеомики белков, регулируемых под действием веществ, а также белков, предположительно участвующих в передаче сигнала. В результате на центральные позиции предсказанных схем белок-белкового взаимодействия были помещены белки mус и р53 для ааптамина, TNF для деметилоксиааптамина и все эти три белка для изоааптамина, указывая тем самым на возможные мишени или эффекторы исследуемых алкалоидов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-32037.

Изучение механизмов противоопухолевого действия морского алкалоида монанхоцидина на лекарственно-устойчивых клетках эмбриокарциномы человека

С.А. Дышловой^{1,2*}, А.Г. Гузий¹, Т.Н. Макарьева¹, В.А. Стоник¹, Ф. Хонекер²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, г. Владивосток, Россия

²Клиника Эппендорф при университете Гамбурга, г. Гамбург, Германия

*dishlovoy@mail.ru

В продолжение изучения биологической активности новых метаболитов морских губок мы исследовали механизм цитотоксического действия нового гуанидинового алкалоида монанхоцидина, выделенного из морской губки *Monanchora pulchra*, на лекарственно-устойчивых опухолевых клетках эмбриокарциномы человека NT2-R.

На первом этапе работ нами был показан одинаковый уровень цитотоксической активности как по отношению к цисплатин-чувствительным (NT2), так и цисплатин-устойчивым (NT2-R) клеткам эмбриокарциномы человека. Таким образом, монанхоцидин был перспективен в качестве компонента терапии лекарственно-устойчивых типов опухолей. Поэтому далее исследования проводились на клетках NT2-R.

Было показано, что вещество обладает высоким уровнем цитотоксической активности, при этом максимальный эффект достигается на 2-3 сутки обработки клеток веществом. Несколькими методами была доказана способность вещества индуцировать каспаза-3-зависимый апоптоз в наномолярных концентрациях (порядка 500 нМ), при этом антипролиферативный эффект вещества был выражен довольно слабо. Анализ клеточного цикла выявил его остановку в фазе G1 под действием на клетки монанхоцидина, то есть обработка веществом препятствовала переходу клеток в стадию синтеза ДНК.

С помощью Вестерн-блоттинга, а также методов флуоресцентной микроскопии была показана способность монанхоцидина вызывать деградацию альфа-тубулина в цитотоксических концентрациях. Примечательно, что одновременно с этим в обработанных монанхоцидином клетках наблюдались заметная деградация ряда клеточных белков, в частности киназы ERK, на фоне её одновременной активации (фосфорилирования).

Анализ протеома выявил изменения в ряде белков, происходящие в обработанных монанхоцидином клетках. Биоинформатический анализ полученных данных поставил белок-супрессор опухолей p53 на центральное место в схеме взаимодействия открытых методом протеомики регулируемых под действием монанхоцидина белков, а также белков, предположительно участвующих во взаимодействии. Это говорит о том, что эффект монанхоцидина на клетки, скорее всего, опосредован белком p53. Функциональный анализ регулируемых белков показал, что большинство из них так или иначе принимают участие в онкологических процессах, а значит, исследуемое соединение является перспективным в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Работа выполнена при поддержке молодежного гранта ДВО РАН №12-III-B-05-020

Получение трансгенных растений сои (*Glycine max* (L.) Merr.) методом агробактериальной трансформации

О.С. Ефремова

*Приморский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Уссурийск, Россия
fe.smc_rf@mail.ru*

Все больше расширяются в мире географические границы культуры сои (*Glycine max*). Важнейшими факторами, ограничивающими рост урожаев сои, в условиях интенсивного земледелия являются болезни. Поражение патогенными грибами вызывает не только количественное снижение урожая, но и ухудшает его качество. В настоящее время основным методом борьбы с ними является обработка растений химическими веществами, обладающими фунгицидными свойствами. Конечно, при этом для использования в качестве фунгицидов отбираются только относительно неопасные ядохимикаты, последние, накапливаясь в окружающей среде, тем не менее, наносят ущерб среде обитания. Возникает необходимость поиска иных средств защиты растений от фитопатогенов.

Разработанные в последние годы биотехнологические методы работы с растениями расширили пределы использования нужных для работы генов, контролирующих синтез белка, обладающего антимикробными свойствами. Задача сводится к получению трансгенных растений сои, содержащих в своем геноме ген, который позволит расширить пределы устойчивости растений.

Для генетической трансформации использовали агробактерию, содержащую Ti-плазмиду с антимикробным пептидом, обеспечивающим устойчивость к повреждающему действию и имеющим кодирующую последовательность гена, предающим устойчивость растениям к селективному агенту – канамицину.

Объект трансформации- семена сои Приморская 81 и Приморская 28.

Для регенерации растений использовались различные типы сред на основе среды Мурашиге-Скуга (MS) а в качестве эксплантов – гипокотили и стебли.

Было получено около 140 готовых к трансформации эксплантов. Трансформация эксплантов была проведена по стандартной методике. Отбор трансформантов происходил на селективных средах, содержащих антибиотик канамицин в концентрации 75 мг/л. При селекции на канамицине было отобрано 58 зеленых растений, способных к образованию корней. Индивидуальные побеги, культивировавшиеся на среде с канамицином проявляли разную степень устойчивости к антибиотику, и неустойчивые побеги со временем меняли окраску и постепенно отмирали.

Все трансформированные растения были подвергнуты проверке методом ПЦР. Трансгенный статус был подтвержден для одного растения сорта Приморская 28. ПЦР-анализ показал, что в результате трансформации у растений сои прошедших селекцию на канамицине, произошла интеграция гена в геном растений.

Ультраструктурные особенности сперматогенеза мариты *Opisthorchis felineus*

М.В. Жукова*, М.Н. Львова, А.В. Катохин, В.А. Мордвинов, Е.В. Киселева
Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение РАН, г. Новосибирск, Россия
* zhukovamv@gmail.com

Описторхоз - одно из опасных инвазионных заболеваний человека, возбудителем которого является кошачья двуустка *Opisthorchis felineus*. Несмотря на важность исследования особенностей функционирования *O. felineus* в печени человека (стадия мариты) и их высокую практическую значимость, ультраструктура этих паразитических червей остается малоизученной. Электронно-микроскопические данные о системах органов *O. felineus*, и в частности репродуктивной системы, важны для последующего изучения воздействия на них антигельминтных препаратов. В настоящей работе проведено детальное электронно-микроскопическое исследование семенников *O. felineus*.

Сперматогенез у *O. felineus* происходит в двух семенниках, расположенных в задней части тела. Нами установлено, что общая схема процесса сперматогенеза *O. felineus* сходна со схемой большинства паразитических червей класса Trematoda. Сперматогонии митотически делятся 3 раза с образованием 8 сперматоцитов первого порядка, соединенных между собой цитофором. Затем 8 сперматоцитов вступают в первое мейотическое деление. После первого деления мейоза образуются 16 сперматоцитов второго порядка, а после второго - 32 сперматиды, из которых затем в процессе спермиогенеза формируются сперматозоиды. Электронно-микроскопический анализ срезов семенников мариты *O. felineus*, показал, что на начальных стадиях сперматиды имеют округлые ядра. Затем ядра удлинняются, приобретая бочковидную форму, и хроматин в них конденсируется. Согласно общим закономерностям Trematoda, спермиогенез *O. felineus* начинается с формирования зоны дифференциации в апикальной части каждой сперматиды. Сводчатые мембраны ограничивают эту зону, содержащую две центриоли и межцентриолярное тельце. Зона дифференциации окружена рядом кортикальных микротрубочек. В процессе спермиогенеза, центриоли дают начало двум жгутикам, растущим под углом около 180° относительно друг друга. Затем последовательно образуются два исчерченных отростка, связанных с центриолью, которые, возможно, необходимы для последующего изменения ориентации жгутиков при формировании сперматозоида. В ранее исследованных видах трематод исчерченные отростки формируются перед образованием жгутиков. Образование отростков после сборки жгутиков является отличительной особенностью спермиогенеза *O. felineus*. Исчерченные отростки имеют ячеистую структуру на поперечном срезе. В процессе спермиогенеза кортикальные микротрубочки удлинняются в область центрального цитоплазматического расширения. Затем оба жгутика поворачиваются и опускаются вниз, параллельно центральному расширению, в плазматической мембране которого на этой стадии выявляются 4 электронно-плотные зоны будущего прикрепления жгутиков. Ядро, а затем одна из митохондрий начинают мигрировать в центральное цитоплазматическое расширение. Жгутики, один за другим, сливаются с мембраной центрального цитоплазматического расширения, а миграция второй митохондрии происходит на последней стадии формирования сперматозоида. Развитие крупных цистерн эндоплазматического ретикулума предшествует замыканию кольца сводчатых мембран, которые отделяют созревший сперматозоид от остаточной части цитоплазмы сперматиды. Таким образом, несмотря на сходство процесса сперматогенеза *O. felineus* с тем, что описано ранее для представителей других изученных видов класса Trematoda, нами впервые выявлены отличительные особенности, специфичные только для вида *O. felineus*.

Работа поддерживалась Междисциплинарным Интеграционным грантом СО РАН №19.

Определение суммы флавоноидов в шлемнике байкальском спектрофотометрическим методом

С.П. Зорикова, В.М. Колдаев

Горнотаежная станция, Дальневосточное отделение РАН, п. Горнотаежное, Россия

Шлемник байкальский (*Scutellaria balcalensis* Georgi, семейство губоцветных – *Labiatae*) – традиционное лекарственное растение восточной медицины. Лечебные эффекты корней шлемника главным образом обусловлены флавононовым агликоном 7-О-глюкуронидом, или байкалином. Экстракты корней шлемника проявляют гипотензивные и седативные свойства. Флавоны шлемника имеют характерную Р-витаминную активность, проявляющуюся сосудоукрепляющим и антиоксидантным действием. Флавоноиды шлемника определяют трудоемким методом жидкостной хроматографии. Целью работы являлась разработка простого и достаточно чувствительного метода экспресс-анализа для оценки суммарного содержания флавоноидов в экстрактах шлемника.

Выбор метода основан на том, что хлорид алюминия ($AlCl_3$) образует хелатные комплексы с флавоноидами, в результате чего происходит смещение максимумов спектров поглощения, или батохромный эффект. Для анализа батохромных эффектов применялась спектрофотометрия, позволяющая исследовать растворы без предварительной подготовки. В опытах использовали этанольные настойки корней шлемника байкальского, произрастающего в Приморском крае, а также этанольные растворы очищенного байкалина (фирма Vendor World-Way Inc.) и $AlCl_3$. Спектры поглощения регистрировали на цифровом спектрофотометре UV2051PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне от 230 до 400 нм. В спектрах поглощения очищенного байкалина имеются три максимума на длинах волн 245, 278 и 317 нм. Через 20 мин после добавления $AlCl_3$ наблюдается наибольшее смещение третьего максимума до длины волны 334 нм, которая выбрана в качестве аналитической длины волны. Спектры поглощения настоек на корнях шлемника регистрировали через каждые 10 мин после добавления $AlCl_3$ в течение 90 мин. Высота смещенного максимума на аналитической длине волны линейно зависит от концентрации флавоноидов. Методом регрессии было получено калибровочное уравнение, с помощью которого определяли содержание суммы флавоноидов в пробах экстрактов корней шлемника байкальского.

Использование батохромных эффектов, возникающих как результат образования комплексов $AlCl_3$ с флавоноидами, перспективно для экспресс-анализа суммы флавоноиды не только в экстрактах шлемника байкальского, но и других лекарственных растений.

Поиск новых токсинов ASIC3-каналов из актинии *Heteractis crispa*

Р.С. Калина^{1*}, А.Н. Кветкина¹, И.Н. Гладких², В.М. Табакмахер², О.Н. Кривошапко²,
М.М. Монастырная², Э.П. Козловская²

¹Дальневосточный Федеральный Университет, г. Владивосток, Россия

² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*kalinarimma@gmail.com

Боль, причиной которой является ацидоз тканей, возникающий при различных патофизиологических состояниях (воспаление, артриты, ишемия), представляет собой нежелательное явление, резко снижающее качество жизни человека. Достоверно установлено, что изменение кислотно-щелочного равновесия в тканях регулируется протон-чувствительными ионными каналами (ASICs – Acid Sensing Ionic Channels) [1, 2], которые принимают активное участие в формировании и передаче болевого стимула. В настоящее время набор используемых в практике активных лигандов-модуляторов ASIC-каналов ограничен в основном амилоридными и нестероидными противовоспалительными средствами (аспирин, диклофенак, ибупрофен и др.), действующими как ингибиторы [3] и нейропептидами млекопитающих FMRF-амидами, активирующими ASIC3 каналы [4].

Яды морских кишечнорастворимых, актиний, вызывают большой интерес исследователей, так как содержат биологически активные соединения белковой природы, в том числе нейротоксины, модифицирующие свойства Na^+ -, Ca^{2+} -, K^+ -, ASIC3-каналов и TRPV1-рецепторов. Целью данной работы является поиск новых нейротоксинов, продуцируемых актинией *Heteractis crispa*, способных модулировать активность ASIC3-каналов.

Из 70% этанольного экстракта актинии *H. crispa* с помощью гидрофобной хроматографии на полихром-1 была получена фракция полипептидов, элюируемая 20% этанолом. По данным MALDI-TOF масс-спектрометрии она содержала полипептиды в основном с молекулярными массами от 4500 до 5400 Да. Показано, что при тестировании *in vivo* на «тепловой» и «кислотной» моделях полипептиды этой фракции в концентрациях 8 и 25 мкг/мышь, соответственно, обладали анальгетической активностью. На модели острого воспаления лапы мыши, индуцированного каррагинаном, полипептиды в дозе 25 мкг/мышь оказывали сильное противовоспалительное действие, замедляя развитие воспалительного процесса на 71,6%. Дальнейшее разделение полипептидов 20% фракции проводили с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Nucleosil C₁₈. В результате хроматографии было получено девять полипептидных фракций, которые были проанализированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. В результате их тестирования *in vivo* на «кислотной» модели была выявлена фракция (4520,6 и 4821,3 Да), обладающая наибольшим обезболивающим эффектом. Вероятно, полипептиды этой фракции являются блокаторами протон-чувствительных ASIC3-каналов. В дальнейшем это предположение предстоит проверить экспериментально.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» 12-И-П6-10.

1. Lilley, S.; LeTissier, P.; Robbins, J. // J. Neurosci. 2004, 24, P. 1013-1022.
2. Waldmann, R.; Lazdunski, M. // Curr. Opin. Neurobiol. 1998, 8, P. 418-424.
3. Voilley, N.; de Weille, J.; Mamet, J.; Lazdunski, M. // J. Neurosci. 2001, 21, P. 8026-8033.
4. Lingueglia, E.; Deval, E.; Lazdunski, M. // Peptides. 2006, 27, P. 1138-1152.

Защитное действие хитозана и его низкомолекулярного производного при воспалении толстой кишки у мышей

А. А. Калитник^{1*}, П. А. Марков², А. В. Володько¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН,

²Институт физиологии, Коми Научный Центр, Уральское Отделение РАН

*kalitnik85@mail.ru

Хитозан (деацетилированное производное хитина) - нетоксичный, биоразрушаемый, биосовместимый полисахарид. Хитозан и его производные обладают уникальными физико-химическими свойствами и разнообразной биологической активностью, включая антибактериальную, противовирусную, антиопухолевую и др, что обеспечивает возможность широкого использования этого полисахарида в медицине и фармации. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что хитин, хитозан, различные их производные, в том числе олигосахариды и глюкозамин, оказывают разнонаправленное влияние на механизмы регуляции клеточного и гуморального иммунного ответа, повышают эффективность доставки и лечебного действия различных препаратов, и, кроме того, проявляют противовоспалительное и защитное действие при ряде тяжелых заболеваний. Это позволяет рассматривать эти полисахариды природного происхождения, а также их производные, в качестве препаратов для профилактики и лечения заболеваний, вызванных различными нарушениями иммунной системы, острыми или хроническими воспалительными процессами в организме.

В данной работе на модели острого язвенного колита проведено изучение способности хитозана и его низкомолекулярного (НМ) производного защищать кишечную стенку от повреждения.

Хитозан с молекулярной массой (ММ) 115 кДа и степенью ацетилирования (СА) 1,5 % (ВМ-Х) был получен щелочной обработкой хитина, согласно принятой методике. НМ-производное хитозана получали свободно-радикальной деполимеризацией с помощью пероксида водорода, с дальнейшей гель-фильтрацией полученных олигосахаридов на колонке с сефадексом G-50 и выделением фракции с молекулярной массой 5.5 кДа. Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии было установлено, что структура этого НМ-производного (НМ-Х) соответствует структуре полимера и его степень ацетилирования составляет 1 %.

Противовоспалительное действие ВМ-Х и НМ-Х изучали в эксперименте *in vivo* на мышах. Исследуемые вещества вводились перорально мышам в дозе 50 мг/кг за 24 часа индукции воспаления. В качестве положительного контроля использовали преднизолон - гормональный противовоспалительный препарат (5 мг/кг). Противовоспалительное действие образцов оценивали по морфологическим и биохимическим показателям, в частности по степени и площади повреждения стенки толстой кишки, а также активности миелпероксидазы. Установлено, что хитозан и его НМ-производное при пероральном введении оказывают защитное действие при химическом поражении стенки толстой кишки у мышей в дозе 50 мг/кг. Степень защитного действия полисахаридов была сравнима с действием преднизолона и характеризовалась снижением площади поражения более чем в два раза и уменьшением степени повреждения на 40%. Активность миелпероксидазы снижалась в 2,5 раза.

Численный анализ форм прикрепленных *in vitro* гемоцитов морских беспозвоночных

Ю.А. Каретин

Институт биологии моря им. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
yura15cbx@gmail.com

Исследование морфологии клеток имеет значение как для понимания функционального состояния самих клеток, так и для исследования функционирования и развития надклеточных систем, от тканевого до организменного уровня. Работа выполнена на 628 гемоцитах двустворчатого моллюска каллиста короткосифонная *Callista brevisiphonata* (*Bivalvia*, *Veneridae*) (Carpenter, 1864). Для описания клеточной формы использовано 36 (в том числе 19 линейных и 17 нелинейных) параметров. Изначальный набор параметров был исследован на наличие высоко коррелированных признаков с использованием корреляционного анализа ($p \leq 0,0005$). Слабо коррелированные признаки были отобраны для факторного анализа, (факторные нагрузки: Varimax raw, выделение: Principal axis factoring), на основе которого было выделено три фактора, содержащих основную нагрузку факторными переменными (всего 9 переменных). Оказалось, что признаки, основные нагрузки которых сосредоточились внутри одного фактора, описывают сравнительно близкие особенности клеточной морфологии. Фактор 1 оказался существенно нагружен характеристиками размера клеток, фактор 2 существенно нагружен нелинейными параметрами морфологии клеток, фактор 3 оказался нагружен факторами, описывающими округлость клетки. Три фактора, выделенные факторным анализом были использованы в качестве переменных иерархического кластерного анализа (метод не взвешенного парного среднего, евклидово расстояние). В результате выделены четыре кластера, включающие морфологически различные типы клеток:

Кластер I включает очень крупные, достаточно симметричные распластанные клетки с большим количеством отростков примерно равной длины и большой площадью «тела» клетки. Кластер II объединяет крупные клетки со сравнительно небольшой площадью «тела» часто неправильной формы и несколькими очень длинными отростками, смещающими основную массу клетки в крайне ассиметричное относительно центра изображения положение. Кластер III объединил клетки вытянутой формы, причём в кластер вошли как клетки с одним длинным массивным отростком, придающим им вытянутый характер, так и движущиеся амeboидные клетки ламеллоподиального типа, вытянутые поперёк направления движения, то есть клетки, вытянутость которых имеет различную природу. Кластер IV собрал все клетки промежуточного типа.

Выделенные кластеры достоверно различались по ряду использованных параметров, что подтверждает способность данной статистической методологии на основании использованных признаков достоверно дифференцировать популяцию распластанных амeboидных клеток *in vitro*, выделяя внутривидовые клеточные типы. Ранее была показана возможность межвидового разделения популяций клеток *in vitro* с использованием ряда линейных и нелинейных параметров, описывающих морфологию распластанных клеток [1,2]. Обнаруженные в выборке гемоцитов двустворчатого моллюска численные различия между группами клеток могут объясняться различиями в организации цитоскелета, распределении молекул клеточной адгезии, клеточным поведением и другими факторами, влияющими на форму распластанной клетки.

1. Каретин, Ю.А. // *Биология моря*. 2010, 5, 362-367.
2. Каретин, Ю.А. // *Биология моря*. 2010, 6, 424-428.

Противовоспалительное и антиагрегационное свойства конъюгата бетациклодекстрина с ацетилсалициловой кислотой

Е.А. Ким

ГБОУ ВПО Амурская государственная медицинская академия

Науч. рук-ль: зав. каф. общ. химии АГМА, к.х.н. Т.А. Баталова

Zheka-kim-a@mail.ru

Циклодекстрины представляют собой регулярно построенные циклические олигосахариды, в которых фрагменты D-глюкопиранозы соединены α -1-4-гликозидными связями. На сегодняшний день, в силу относительной дешевизны, биоразлагаемости и нетоксичности, они нашли широкое применение в различных областях химии, в первую очередь супрамолекулярной химии, тонком органическом синтезе и в ряде междисциплинарных направлений. Особый интерес к циклодекстринам обусловлен как их циклическим строением, так и наличием внутренней гидрофобной полости, способной к образованию клатратов типа «гость-хозяин» с различными органическими субстратами, в частности с лекарственными препаратами.

В нашем исследовании использовалось производное ацетилсалициловой кислоты и β -циклодекстрина (АКЦД). β -Циклодекстрин – циклический олигосахарид, состоящий из 7 остатков глюкозы, имеющий 21 реакционноспособную гидроксильную группу. Сегодня циклодекстрины привлекли внимание специалистов различных областей и применяются для улучшения растворимости в воде, предотвращения слеживаемости, стабилизации веществ, конструирования наночастиц. АКЦД представляет собой смесь производных сложных эфиров ацетилсалициловой кислоты и β -циклодекстрина со средней степенью замещения 3,5.

На первом этапе проводились эксперименты *in vitro* по изучению влияния синтезированных производных на агрегацию тромбоцитов. Результаты показали большее снижение агрегации тромбоцитов при воздействии АКЦД по сравнению с АК. Так, при равной концентрации (в пересчете на эквиваленты АК) АКЦД показал снижение агрегации тромбоцитов в 6 раз по сравнению с раствором свободной АК.

На втором этапе проводились эксперименты *in vivo* по изучению влияния АКЦД. Исследования проводились на белых беспородных лабораторных крысах-самцах. Животные были разбиты на три группы: 1 – интактная (10), получавшие инъекции физраствора; 2 – контрольная группа (10), получавшая АК; 3 – экспериментальная группа (10), получавшая АКЦД. Препараты вводились внутривенно. Концентрация АК соответствовала терапевтической дозе. Доза АКЦД, в концентрации в пересчете на эквивалент АК, соответствовала $\frac{1}{2}$ дозе АК (группа сравнения). Двойное уменьшение дозы было выбрано для предотвращения резкого снижения свертываемости крови, принимая во внимание эксперименты *in vitro*. Свертываемость крови оценивалась лабораторным тестом ПТИ. Противовоспалительный эффект оценивался по уменьшению объема лапы при отеке, вызванном асептическим воспалением, лабораторными показателями числа лейкоцитов, общего белка. Эксперимент продолжался в течение семи дней. Результаты показали, что несмотря на то, что экспериментальная доза химического соединения из β -циклодекстрина и аспирина была в 2 раза ниже дозы аспирина в контрольной группе, антиагрегационный и противовоспалительный эффекты были выражены у подопытных животных в более значительной мере. Данное явление можно связать с тем, что β -циклодекстрин и его многочисленные производные являются своеобразными «контейнерами» лекарственных препаратов. Имеются достоверные сведения о том, что в изучаемом нами химическом соединении, в биосреде, происходит отщепление АК от ЦД. Вероятно, что интенсивность этого отщепления наиболее высока в месте воспаления. Благодаря этому, в патологическом очаге воспаления количество противовоспалительного препарата, доставленного циклодекстрином становится больше, чем в группе с обычной формой препарата, что и предопределяет более низкую терапевтическую дозу АКЦД.

***Fagopyrum esculentum* Moench – перспективный источник флавоноидов**

А.Г. Клыков^{1*}, Т.В. Танашкина², А.В. Гажа²

¹Приморский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, г. Уссурийск, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

* fe.smc_rf@mail.ru

В медицинской практике успешно применяются лекарственные растения, содержащие флавоноиды. Виды рода *Fagopyrum* Mill. в качестве основного компонента содержат рутин, который обладает антиоксидантным действием и капилляроукрепляющей активностью. Источником получения рутина в фармацевтической промышленности являются бутоны софоры японской *Sophora japonica* L., однако промышленная сырьевая база указанного растения в России отсутствует. Потребность в данном препарате удовлетворяется за счёт импорта (Бразилия, Китай).

В связи с этим поиск перспективных отечественных источников флавоноидов с Р-витаминной активностью - одна из актуальных проблем фармацевтической промышленности. Растения вида *Fagopyrum esculentum* Moench имеют достаточную сырьевую базу, широко используются в сельском хозяйстве в качестве крупяной и медоносной культуры. Исследования, направленные на изучение разных сортов и форм вида *F.esculentum* с целью выделения перспективного источника сырья для получения рутина являются актуальными.

Полевые эксперименты в 2011 году проводились в Приморском НИИСХ (п. Тимирязевский, Уссурийский район, Приморский край), лабораторные - в ДВФУ (г. Владивосток). Объектом исследования являлись сорта *F. esculentum* – При 7, Изумруд и Приморочка, красноцветковая, белоцветковая и розовоцветковая форма (Приморский край), Башкирская красностебельная (Республика Башкортостан), Черемшанка, Чатыр Тау и Батыр (Республика Татарстан), Дизайн, Дикуль, Темп, Молва и Диалог (Орловская область). Определение количества флавоноидов (в том числе рутина) в надземной массе *F. esculentum* проводилось хроматоспектрофотометрическим методом.

В фазу массового цветения содержание флавоноидов в надземной массе *F. esculentum* в зависимости от сорта варьировало от 2,16 до 5,51 %. Наибольшее количество флавоноидов выявлено у сортов и форм *F. esculentum* селекции Приморского НИИСХ. Установлено, что основным флавоноидом в надземной массе *F. esculentum* является рутин (70-76 %). Максимальное содержание рутина отмечено у красноцветковой формы - 4,17 % и сорта Приморочка – 3,6 %. Высокая продуктивность зеленой массы и сухого вещества с одного растения выявлено у сорта Изумруд 19,2 и 6,1 г соответственно. Максимальный выход рутина с м² составил у сорта Приморочка – 36,8 г.

Исследования показали, что сорт Приморочка и красноцветковая форма *F. esculentum* с высоким содержанием рутина в надземной массе в фазе массового цветения, можно рассматривать в качестве перспективного источника сырья для получения Р-витаминных препаратов.

Гидрохирургический метод в оптимизации лечения гнойных ран мягких тканей

А.В. Коротких

*Дальневосточный государственный медицинский университет, г. Хабаровск, Россия
ssemioo@rambler.ru*

Многовековая история хирургии тесно связана с проблемой лечения ран мягких тканей, которая остается актуальной и в настоящее время, что подтверждается:

- повышением уровня бытового и производственного травматизма,
- ростом числа гнойно-воспалительных заболеваний,
- риском развития тяжелых осложнений.

Среди комплексных мер по ведению больных с хроническими ранами обработка раны является необходимой составляющей лечебной тактики. Обработка раневого дефекта позволяет перевести рану из состояния хронического «застоя» в активную фазу, стимулирует образование факторов роста, необходимых для формирования грануляционной ткани и готовности раны к пластике и/или первичному заживлению.

Целью работы было применить в лечении ран метод гидрохирургической обработки с помощью системы «Versajet». VersaJet – прибор для хирургической обработки ран. Он состоит из производительной консоли многоразового использования, одноразовой рукоятки и набора трубок в сборе. В основу системы заложено использование водоструйных технологий, обеспечивающих подачу жидкости, в данном случае это физиологический раствор, в высоком скоростном режиме.

Результаты работы: Положительная динамика течения раневого процесса после применения гидрохирургического метода позволила в среднем на $11,9 \pm 1,4$ дня сократить сроки предоперационной подготовки для выполнения аутодермопластики свободным кожным расщепленным лоскутом. Стимулирование спонтанной эпителизации при ожогах II-III А ст. позволило достичь самостоятельного заживления под гидрогелевыми раневыми покрытиями (Hidrocoll, Suprosoub). Сроки стационарного этапа лечения за счет применения метода сократились в 1,7 раза.

Комплексное исследование водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Rhodophyta, Phyllophoraceae)

А.О. Кравченко*, О.С. Белоус

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*kravchenko_25.89@mail.ru

Красные водоросли являются источником уникальных по структуре и физико-химическим свойствам биологически активных веществ. Внутриклеточными компонентами этих водорослей являются водорастворимые белки и пигменты фикобилипротеины (ФБП) - фикоэритрин (ФЭ), фикоцианин (ФЦ), аллофикоцианин (АФЦ), которые благодаря высокой флюоресценции широко используются в иммунофлуоресцентной диагностике, фармацевтике, биотехнологии, косметической и пищевой промышленности. Основные структурные компоненты клеточной стенки водорослей представлены сульфатированными полисахаридами, которые обладают уникальными физико-химическими свойствами, проявляют широкий спектр биологической активности, что обеспечивает их широкое применение в различных областях биотехнологии, пищевой промышленности, фармацевтике. Разработка технологии комплексной переработки красных водорослей с последовательным извлечением из них пигментов и полисахаридов обуславливает необходимость изучения способов экстракции пигментов при различных условиях с целью получения больших выходов требуемых веществ.

Водоросль *A. flabelliformis*, образующая обширные популяции в дальневосточных морях России, может оказаться новым потенциальным источником сульфатированных полисахаридов и пигментов (ФБП). Ранее нами было показано (2009 г.), что содержание ФБП в водоросли *A. flabelliformis* зависит от условий ее обитания. Данная работа посвящена изучению комплексного извлечения ФБП и полисахаридов из водоросли *A. flabelliformis*, собранной в июле 2012 г. в б. Троицы на м. Андреева (репродуктивная форма с цистокарпами) и б. Рисовая (стерильные растения). Для сравнительного анализа подобное исследование было проведено для относящейся к тому же семейству водоросли *Mastocarpus pacificus*, собранной у м. Андреева в этот же период.

ФБП из *A. flabelliformis* и *M. pacificus*, собранных у м. Андреева, экстрагировали с помощью 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,8), а ФБП из *A. flabelliformis* б. Рисовая и м. Андреева – 1,5 % нитратом натрия. После извлечения пигментов из водоросли выделяли полисахариды, проводя их последовательную экстракцию водой при 80 °С трижды. Идентификацию пигментов проводили спектральным методом анализа, по максимумам поглощения на спектральных кривых в области 565 нм для ФЭ, 615-620 нм – для ФЦ, 650 нм – для АФЦ. Согласно результатам анализа, содержание всех ФБП у *A. flabelliformis*, собранной в 2012 г. и у м. Андреева, и в б. Рисовая значительно ниже (5-13 р.), чем у этой же водоросли, собранной в 2009 г. Наблюдаемое различие, вероятно, связано с условиями произрастания водоросли, в частности количестве фотосинтетически активной радиации (ФАР), которое было разным для макрофитов, собранных на глубине (2009 г.) и на поверхности – 2012 г. Согласно анализу, содержание ФЭ у *A. flabelliformis*, собранной у м. Андреева и в б. Рисовая выше, чем у *M. pacificus* в 2,4 и 4,2 раза, соответственно. Экстракция ФБП нитратом натрия увеличивает выход ФЭ практически в 2 раза, по сравнению с фосфатным буфером независимо от места сбора водоросли. Выход экстрагируемого полисахарида после экстракции пигментов был в 2 и 4 раза больше, чем в 2012 и 2009 гг. без выделения пигментов, соответственно, что можно объяснить дополнительным разрушением клеточной стенки в процессе первоначальной обработки буферным раствором. При этом количество полисахарида, выделенного из *A. flabelliformis* в 2012 г., собранного у м. Андреева, на 7,6 % выше, чем у *M. pacificus*.

***Pungitius polyakovi* Shedko - младший синоним *Pungitius tymensis* Nikolsky**

А.Ю. Кравченко

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
sasha_postbox@mail.ru

Из пресных вод юго-восточного Сахалина был описан новый вид *Pungitius polyakovi*. Авторы описания *P. polyakovi* пишут, что он «отличается от *P. tymensis* следующими характеристиками: антеро-вентральный отросток эктокоракоида отсутствует, правый и левый эктокоракоида не контактируют ни друг с другом, ни с местом соединения вентральных концов правого и левого клейтрумов (у *P. tymensis* эктокораконид Y-образный, антеро-вентральный отросток эктокоракоида имеется, правый и левый эктокоракоида контактируют как друг с другом, так и с местом соединения вентральных концов правого и левого клейтрумов); боковые костные пластины на теле отсутствуют (у *P. tymensis* в передней части тела всегда имеется 2-6 (3,3) боковых пластин); модальное число спинных колючек – 10 (11 у *P. tymensis*); у нерестовых самцов темнеет низ головы и брюхо, перепонка брюшной колючки бело-голубая (у нерестовых самцов *P. tymensis* все тело черное, перепонка брюшной колючки темная от основания и почти до ее верхушечной части, остающейся прозрачной)». Основным отличием *P. polyakovi* от *P. tymensis* авторы считают наличие редукции передней части эктокоракоида. Однако редукция эктокоракоида у колюшек широко распространена. в популяциях и видах колюшек с частичной или полной редукцией тазового пояса и покровного вооружения и связана с общим редукционным процессом в семействе Gasterosteidae (Долганов, Кравченко, 2009) и переходом к пресноводному образу жизни. Вид *P. tymensis* на Сахалине обладает ярко выраженной редукцией ошипления, боковых пластин и тазового пояса, вплоть до его полного исчезновения в отдельных популяциях. Поэтому обнаружение популяций *P. tymensis* с частичной редукцией эктокоракоида вполне естественно и прогнозируемо. Редукция эктокоракоида у колюшек верховий р. Шеннон в Ирландии имеет не только межпопуляционный, но и внутривидовой характер. Известно, что признаки, подверженные редукции и изменчивости имеют небольшой таксономический вес, а признаки, обладающие внутривидовой изменчивостью, тем более не могут быть использованы в качестве критерия вида.

Сообщение авторов описания *P. polyakovi* о наличии у *P. tymensis* боковых пластин в передней части туловища всегда (при отсутствии их у *P. polyakovi*) действительности не соответствует. Из литературных данных известно, что у *P. tymensis* тело голое или покрыто 1-2 мелкими боковыми пластинками в передней части тела. В нашей коллекции у колюшек этого вида из р. Красная и р. Белая (бассейн теки Тымь, 41 экз.) пластины в передней части тела отсутствуют.

Приводимое в качестве отличительного признака различие в модальных числах спинных колючек незначительно. Окраска колюшек зависит от прозрачности воды водоемов, где они обитают. На Сахалине в тундровых озерах с непрозрачной «гумусовой» водой и вытекающих из них водотоках они значительно темнее, чем в пойменных озерах и старицах с более прозрачной водой.

Из изложенного выше следует, что все отличительные признаки *P. polyakovi* подвержены достаточно сильной изменчивости и не могут быть использованы для выделения нового вида. Подобная изменчивость позволяет рассматривать пресноводных колюшек юго-восточного Сахалина только в качестве популяций вида *P. tymensis* (Nikolsky), 1889.

1. Долганов В.Н., Кравченко А.Ю. О направленности морфологической изменчивости колюшек рода *Pungitius* (Gasterosteidae) // Изв. ТИНРО. 2009. Т. 159. С. 204-207.
2. Кравченко А.Ю. О валидности девятииглой колюшки *Pungitius polyakovi* S.Shedko. M.Shedko et Pietch. // Изв. ТИНРО. 2012. Т. 169. С. 59-62

Экспрессия гена *Sox17a* при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix*

А.А. Ларионова*, В.В. Панькова, И.Ю. Долматов

Дальневосточный федеральный университет

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*lek_a@list.ru

Регенерация или восстановление утраченных органов важнейшее свойство всех живых организмов. Ее механизмы можно понять только при изучении путей активации генов и структуры белков, синтезирующихся на основе этих генов. Одним из ключевых генов, определяющих спецификацию энтодермы, является *Sox17a* [1]. В частности, он экспрессируется в вегетативных бластомерах у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*, определяя их судьбу во время гастрюляции. Эти бластомеры в дальнейшем дают начало энтодермальным структурам, в частности архентерону.

Гены семейства *Sox* экспрессируются в процессе развития многоклеточных животных. Согласно исследованиям Тзу-Мин Чан с коллегами [2] на *Danio rerio*, *Sox17* – важный транскрипционный фактор для энтодермальных клеток. У других животных транскрипционные факторы *Sox17* также участвуют в спецификации энтодермы. Например, у *Xenopus laevis* на ранних этапах развития они проявляют активность во всей бластуле, управляя развитием энтодермы. У мыши *Sox17* сначала выявляется в энтодерме, и затем постепенно распространяется по всему эмбриону. У мышей, у которых ингибирована активность *Sox17*, энтодерма не развивается. Кроме того, для нормального развития важно взаимодействие *Sox17* с сигнальными путями FGF и BMP. Показано, что BMP подавляет экспрессию *Sox17* на брюшной стороне, а FGF на спинной. Однако, регуляция *Sox17* на геномном уровне пока не выяснена до конца.

Голотурия *Eupentacta fraudatrix* является обычным представителем фауны Японского моря. Этот вид в ответ на различные неблагоприятные воздействия способен выбрасывать кишку, а затем быстро ее восстанавливать. При секвенировании транскриптома регенерирующих зачатков пищеварительной системы *E. fraudatrix* был выявлен фрагмент гена *Sox17a*. Это указывает, что данный ген экспрессируется при восстановлении кишечника, однако не было понятно на какой стадии регенерации происходит его активация. В этой связи целью данной работы было подтверждение наличия и сроки экспрессии гена *Sox17a* при регенерации кишки у голотурии *E. fraudatrix*.

В ходе проведения опыта выяснено, что активация *Sox17a* происходит уже на 3 сутки регенеративного процесса. В результате сиквенса была получена последовательность длиной 172bp. С помощью программы Smart было установлено, что полученная последовательность входит в состав HMG box домена. Анализ последовательности программами Blast и ClustalW показал, что она обладает высокой степенью гомологии с геном *Sox17a* многих видов вторичноротых животных, в частности рыб и земноводных и, следовательно, ген *Sox17a*, достаточно консервативен.

Таким образом, мы показали, что ген *Sox17a* экспрессируется в зачатках кишки у голотурий *E. fraudatrix*. Неожиданным оказалось его ранняя активизация. По данным электронной микроскопии на 3 сутки после эвисцерации происходит формирование соединительнотканной основы будущих органов [3]. Идет активный синтез внеклеточного матрикса. Клетки на этом этапе восстановления только начинают дедифференцировку и миграцию. Вероятно, активация *Sox17a* на 3 сутки после эвисцерации связана с участием этого гена в регуляции дедифференцировки.

1. Meredith Howard-Ashby, Stefan C. Materna, C. Titus Brown, Lili Chen, R. Andrew Cameron, Eric H. Davidson // Developmental Biology, 2006, 300, P. 90–107.

2. Tzu-Min Chan, Chung-Hao Chao, Horng-Dar Wang, Yen-Ju Yu, Chiou-Hwa Yuh // Developmental Biology 326 (2009) 456–470.

3. Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука, 2007. 212 с.

Определение активности лектинов мидии *Crenomytilus grayanus* в ответ на заражение дрожжами *Pichia pastoris*

А.П. Литовченко^{1*}, И.О. Чашин¹, И.В. Чикаловец²

¹Дальневосточный Федеральный Университет, г. Владивосток, Россия

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

* *alishichka@mail.ru*

Лектины – это общее название гликопротеинов, а так же белков, связывающих углеводную цепь, специфически её распознавая. Они широко распространены в биологическом мире, начиная с вирусов и заканчивая млекопитающими. Есть сведения о том, что лектины животных, а особенно лектины беспозвоночных, присутствующие в лимфе, играют важную роль в биозащите, выполняя функцию рецепторов, реагирующих на специфические углеводы клеточных оболочек патогенных микроорганизмов. Таким образом, лектины морских беспозвоночных участвуют в неспецифических иммунных реакциях, узнавая и связывая чужеродный материал.

Целью работы было определение активности лектинов в ответ на заражение мидий *Crenomytilus grayanus* дрожжами *Pichia pastoris*. Для этого мидий, собранных в бухте Троица Хасанского района, садили на неделю в 2 аэрируемых аквариума по 20 шт. в каждый для акклиматизации при постоянной температуре 18°C и солености воды 32‰. Мидий из 1-го аквариума (опытная группа) иммунизировали суспензией дрожжей *P. pastoris*, разведенных стерильным раствором PBS до ОП₆₀₀=0.4, вкалывая в аддуктор по 1 мл раствора. Мидий из контрольной группы иммунизировали аналогичным образом, вкалывая по 1 мл раствора PBS. Животные по 4 особи из каждой группы были проанализированы через 0, 0.5, 3, 6, 12 и 24 часа. Для этого через аддуктор отбирали шприцом гемолимфу и немедленно центрифугировали ее при 2000 об/мин в течение 5 мин, чтоб осадить гемоциты. В лимфе определяли активность лектинов методом гемагглютинации (ГА) и уровень белка методом Лоури.

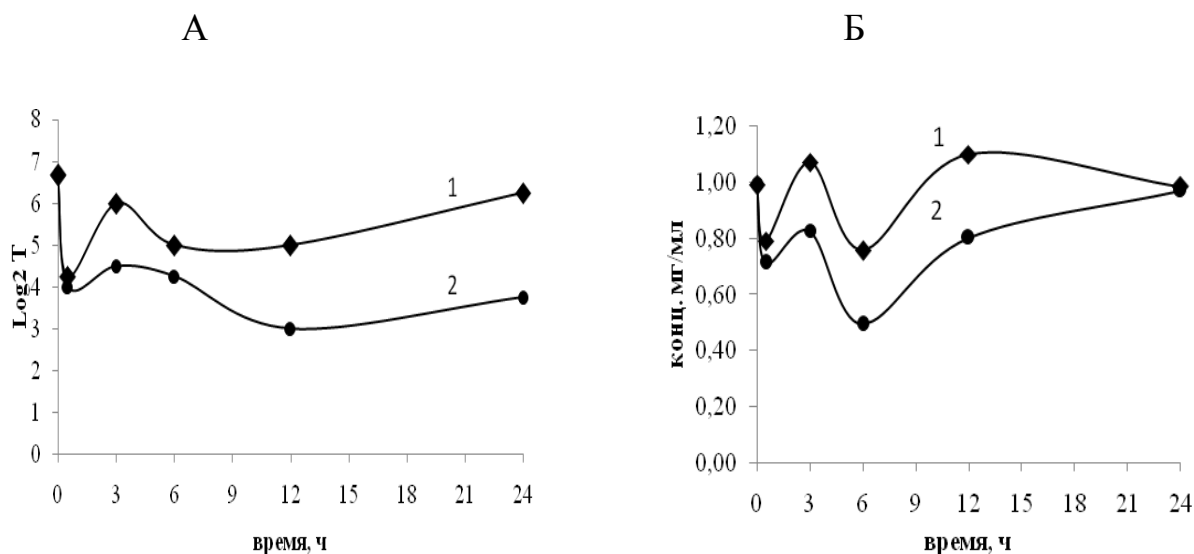


Рис 1. Изменение активности лектинов (А) и концентрации белка (Б) в ответ на заражение дрожжами. 1 – опытная группа, 2 – контрольная группа.

В процессе нашего эксперимента в ответ на введение дрожжей *P. pastoris* через 30 мин после иммунизации титр лектинов резко снижался (Рис. 1 А, кривая 1). По всей вероятности, это было связано с быстрым расходом циркулирующих в гемолимфе молекул лектинов в ходе ответа на антиген и его удаление. Через 3 часа после

иммунизации концентрация лектинов возрастала в 1.5 раза и соответствовала максимальному значению, вероятно, благодаря активации процесса его синтеза и секреции в гемолимфу. Через 6 часов, по мере удаления антигена из организма, концентрация лектина уменьшалась и постепенно возвращалась к исходному уровню.

В контрольной группе животных (Рис. А, кривая 2) также отмечались небольшие изменения в титре ГА, что, вероятно, обусловлено ответом на травму при иммунизации.

При исследовании содержания в гемолимфе общего белка оказалось, что в опытной группе (Рис. 1 Б, кривая 1) через 30 мин после иммунизации его уровень уменьшался, а через 3 часа возрастал, что хорошо коррелирует с титром ГА. Можно предположить, что изменения в уровне белка были напрямую связаны с уровнем лектина.

В контрольной группе также отмечались небольшие колебания в уровнях общего белка (Рис. 1 Б, кривая 2), что, возможно, также было обусловлено травмой. При этом наблюдалась корреляционная зависимость с титром ГА. Можно предположить, что изменения в уровне белка были напрямую связаны с уровнем лектина, поскольку известно, что в моллюсках содержание лектинов в гемолимфе может достигать 60% от общего белка.

На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемые лектины являются компонентами гуморального иммунитета мидии и участвуют в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов.

Оценка образцов риса коллекции ВНИИР по хозяйственно-биологическим признакам

А.В. Любичкая

*Приморский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии
сельскохозяйственных наук, г. Уссурийск, Россия
lav25ann@mail.ru*

Рис – наиболее распространенная крупяная культура на земном шаре, он является основным продуктом питания для 2/3 населения земли. Посевные площади, занимаемые под рисом в Приморском крае за последние годы, увеличились до 27 тыс. га.

В мире существует большое разнообразие видов культурного риса.

Сорт является одним из наиболее эффективных средств повышения сельскохозяйственного производства. Основным методом ведения селекционных работ по рису является гибридизация.

Важная роль в повышении современных проблем селекции принадлежит исходному материалу – богатому видовому и сортовому разнообразию растений, сосредоточенному в нашей стране в мировой коллекции ВНИИР и рабочих коллекциях научных учреждений.

Поэтому исходный материал остается гарантом дальнейшего развития селекции в выведении сортов с новыми признаками и свойствами при применении ею современных методов, путем реализации биологических особенностей селекционируемых растений и закрепления лучших признаков.

В связи с этим целью работы является оценка образцов риса коллекции ВНИИР по хозяйственно-биологическим признакам.

Следовательно, при создании новых отечественных сортов риса с высоким качеством зерна нужно шире использовать лучшие образцы мировой селекции.

В настоящее время в лаборатории селекции и семеноводства риса Приморского НИИСХ изучается около 150 образцов риса коллекции ВНИИР.

Так, в процессе исследований выделились образцы, обладающие не только хозяйственно-биологическими признаками (устойчивость к полеганию, осыпанию, грибковым болезням, в частности пирикулярриозу, продуктивность и т.д.), но и полезными потребительскими свойствами (внешний вид продукции и содержания в ней полезных веществ). Это образцы из Украины, Краснодар, Японии, Китая, Приморского края – со стекловидным эндоспермом от 90,5 до 96,0%, массой 1000 зерен до 39,0 г, содержанием белка 10,1-13,2%. Образцы из Казахстана и Узбекистана отличились достаточно высоким содержанием амилозы (компонент крахмала) в зерне от 20,1 до 22,8%, что очень важно для консистенции рисовой каши при варке. Существует такая закономерность, чем выше содержание амилозы, тем рассыпчатей каша.

Таким образом, для выведения отечественных сортов необходимо использовать в селекции уже изученный материал, имеющий максимум хозяйственно ценных признаков.

Изменение метаболизма нейтрофилов, зараженных хантавирусом

И.Н. Ляпун^{1*}, Н.Г. Плехова^{1,2}, Г.Г. Компанец¹, Л.М. Сомова¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН,
г. Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия
*irina-lyapun@list.ru

При инфицировании вирусом в клетке наблюдаются специфические морфологические и цитофизиологические изменения, которые не встречаются при других патологических состояниях клеток. Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы и моноциты/макрофаги) одними из первых подвергаются инфекционному воздействию вирусов и принимают активное участие в развитии заболевания – геморрагической лихорадки с почечным синдромом, инфекционным агентом которого является хантавирус (ХВ) (Marcotić A. et al., 2007). Иммуная функция нейтрофилов при вирусных инфекциях, главным образом, ассоциируется с фагоцитозом инфекционных агентов и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе нитроксидных и кислородных радикальных соединений и иммунорегуляторных протеинов (Evans T.J. et al, 1996). Цель исследования – изучить ферментативную активность нейтрофилов, зараженных хантавирусом.

Первичную культуру нейтрофилов морских свинок получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление путем введения стерильного 10 % мясопептонного бульона (5 мл). Через 18 ч, собирали лейкоцитарный концентрат и концентрацию клеток доводили до 4×10^6 кл/мл. После адгезии в течение 40 мин монослой нейтрофилов отмывали от неадгезированных клеток и заражали вирулентным и авирулентным штаммами ХВ, исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вируса, используемого для заражения, не менее 5 инфекционных ед. на клетку. Под воздействием вируса исследовалась активность ферментов нейтрофилов: аденозин-моно-5'-фосфатазы (АМФ) и аденозинтрифосфатазы (АТФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), цитохромоксидазы (ЦХО), миелопероксидазы (МПО) и внутриклеточное содержание неферментных катионных белков (КБ).

Установлено, что после заражения ХВ активность АМФ и АТФ нейтрофилов повышалась (45 мин), затем снижалась (3 ч) и вновь повышалась до конца срока наблюдения (6 ч). Эти данные указывали на выраженную стимуляцию клеток при их контакте с ХВ, т.к. известно, что наличие активности этих ферментов отражает пространственное изменение плазмалеммы. При заражении нейтрофилов вирулентным и авирулентным штаммами ХВ не выявлено существенных отличий в активности АТФ и АМФ. Характерной особенностью метаболизма нейтрофилов является их способность под влиянием различных факторов генерировать кислородные радикалы. В клетках, зараженных авирулентным штаммом ХВ, активация ЛДГ проходила на ранних сроках заражения (45 мин), тогда как при инфицировании вирулентным – в более поздний период (6 ч). При исследовании активности ЦХО в этих клетках выявлена похожая динамика. Установлено, что внутриклеточное содержание МПО и неферментных катионных белков в нейтрофилах повышалось и не зависело от вирулентных свойств штаммов ХВ, которыми были инфицированы клетки.

Таким образом, полученные результаты показывают, что авирулентный штамм ХВ оказывает воздействие на кислородообразующую активность нейтрофилов уже на ранних сроках после заражения, о чем свидетельствовала активация митохондриальных ферментов третьего порядка – лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Тогда как вирулентный штамм ХВ вызывал активацию этих ферментов в клетках на поздних сроках после заражения.

1. Marcotić A., Hensley L., Daddario K., Anderson K., Schmaljohn C. // Coll. Antropol. 2007, 31(4), P. 1159-1167.
2. Evans T.J., Buttery L.D.K., Carpenter A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, 93, P. 9553–9558.

Пролиферативный потенциал клеток личинок мидии *Mytilus trossilus* в культуре и локализация $\alpha V\beta 3$ -подобного интегрина в клетках в процессе нейрональной и мышечной дифференцировки

М.А. Майорова¹, Н.А. Одинцова^{1,2}

¹Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

Рост клеток в культуре определяется балансом генетической программы и взаимодействий клеточной поверхности и внеклеточного матрикса. Регуляция пролиферации и дифференцировки происходит за счет взаимодействий различных рецепторов адгезии. Один из классов таких рецепторов, – интегрин, большое семейство трансмембранных белков, каждый из которых состоит из двух субъединиц [2]. Эти белки присутствуют в клетках всех многоклеточных животных. Было показано, что интегрин-зависимый механизм определяет адгезию и дифференцировку мышечных клеток мидии *Mytilus trossulus in vitro* [3], однако, тип интегринов, участвующих в этом процессе установлен не был. Интегрин $\alpha V\beta 3$ участвует в процессах миогенной и нейрональной дифференцировки у позвоночных животных, является рецептором для фибронектина и витронектина, распознавая специфическую последовательность, состоящую из трех аминокислот - Arg-Gly-Asp (RGD мотив). В центре внимания данного исследования участие этого интегрин в процессах миогенеза и нейрогенеза моллюсков, а также способность клеток в первичной культуре к митотическому делению на разных сроках культивирования.

В качестве объектов исследования были использованы клетки личинок мидии *Mytilus trossulus*. Личинок для экспериментов собирали на стадии средней трохофоры (24 ч после оплодотворения). Для культивирования клеток личинок использовали предварительно обработанные адгезинами (фибронектином или коллагеном) покровные стекла.

На фибронектине максимальное число пролиферирующих клеток мидии в культуре появляется через 12 час после посадки, но спустя 3 суток количество таких клеток резко уменьшается, падая на 9 сутки практически до нуля. На коллагене количество делящихся клеток даже на 15 сутки культивирования превышает 10%, что сопоставимо с максимальным количеством делящихся клеток на фибронектине.

Кроме того, на фибронектине идет активная дифференцировка клеток в миогенном и нейрональном направлениях. Было показано, что клетки личинок мидии экспрессируют $\alpha V\beta 3$ -подобный интегрин, однако распределение этого интегрин не является повсеместным, а зависит от типа клеток и времени культивирования [4]. Судя по полному отсутствию $\alpha V\beta 3$ -подобного интегрин в мышечных (парамиозин-позитивных) клетках на всех сроках культивирования, мышечные клетки не используют этот интегрин для адгезии, хотя в отдельных клетках $\alpha V\beta 3$ -подобный интегрин солокализован с актином. В некоторых клетках $\alpha V\beta 3$ -подобный интегрин солокализован с маркерами нейрональной дифференцировки – нейромедиаторами серотонином (5-НТ) или пептидом Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRF-амидом). Среди FMRF-амид-позитивных клеток можно выделить два клеточных типа: экспрессирующие и неэкспрессирующие данный интегрин. Через 2 суток большинство клеток первого типа находилось в небольших агрегатах, количество которых возрастало в процессе культивирования. Наши данные показывают, что $\alpha V\beta 3$ -подобный интегрин не участвует в миогенной дифференцировке клеток личинок мидии, но может быть связующим агентом между внеклеточным матриксом и нейрон-подобными клетками.

1. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // Cell. 2002, 110, 673–687.

2. Odintsova, N. A.; Dyachuk, V. A.; Nezlin, L. P. Muscle and neuronal differentiation in primary cell culture of larval *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Cell Tissue Res. 2010, 339 (3), 625–637.
3. Odintsova, N.A.; Maiorova, M.A. Localization of α β 3-like integrin in cultivated larval cells of the mussel *Mytilus trossulus* during neuronal and muscle differentiation // J Mol Histol. 2012, DOI: 10.1007/s10735-012-9428-9.

Токсин бактерий *Bacillus thuringiensis var. israelensis* способствует горизонтальному переносу симбиотических бактерий *Wolbachia* между линиями *Drosophila melanogaster*

Д.А. Малькеева¹, М.В. Жукова², Е.В. Киселева^{2*}

¹ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия

* elka@bionet.nsc.ru

Bacillus thuringiensis — грамположительные спорообразующие почвенные бактерии, факультативные анаэробы, продуцирующие видоспецифичные белковые токсины (ВТ-токсины). При попадании в кишечник личинок насекомых токсины *B. thuringiensis* подвергаются протеолизу и активируются, вызывая появление пор в мембранах клеток кишечного эпителия. Это свойство ВТ-токсинов используется для истребления личинок различных видов насекомых-вредителей: существует множество коммерческих препаратов на основе токсинов *B. thuringiensis*. Гибель личинок от ВТ-токсина происходит не только по причине нарушения целостности кишечника, но и в результате проникновения в организм личинок микроорганизмов, в том числе и патогенных, через пищеварительный тракт. На этом основании мы предположили, что ВТ-токсины *B. thuringiensis* могут быть использованы для инфицирования плодовых мушек *Drosophila melanogaster* бактериями *Wolbachia*.

Бактерии *Wolbachia* являются облигатными эндосимбионтами членистоногих и нематод и встречаются приблизительно у 66 % видов насекомых. Передача *Wolbachia* из одного поколения хозяев в другое осуществляется трансвариально, а горизонтальный перенос бактерий между особями одного или разных видов является достаточно редким явлением. В настоящей работе представлен новый метод инфицирования *D. melanogaster* эндосимбиотическими бактериями *Wolbachia*, основанный на применении ларвицидного препарата «Бактицид», в состав которого входит ВТ-токсин без примеси других биологически активных веществ. «Бактицид» - ларвицидный препарат кишечного действия, полученный на основе микробной культуры *Bacillus thuringiensis var. israelensis* и предназначенный для уничтожения личинок двукрылых насекомых, в частности, комаров. Метод заключается в содержании личинок III возраста *D. melanogaster*, не инфицированных бактериями *Wolbachia*, на стандартном дрожжевом корме с добавлением в его состав препарата «Бактицид» и гомогенизированных мух, инфицированных *Wolbachia* (линия Canton S). Нами были опробованы концентрации 0,09; 0,18; 0,36; 4,50; 9,00; 18,0; 36,0; 90,0 и 180,0 мг/л. Оптимальная концентрация препарата для успешного заражения мух бактериями *Wolbachia* составила 180 мг/л. Получены 2 линии *D. melanogaster* (Oregon R и *w[1118]; Df(3R)Hsp70A, Hsp70Ba[304]*), инфицированные *Wolbachia*, штамм *wMel*. Эффективность инфицирования с использованием оптимальной концентрации препарата для линии *D. melanogaster w[1118]; Df(3R)Hsp70A, Hsp70Ba[304]* составила 11,1%. Полученные нами данные дают возможность предположить, что в природе при попадании в пищу насекомого почвенных бактерий *B. thuringiensis* и бактерий *Wolbachia* мог происходить внутри- и межвидовой горизонтальный перенос эндосимбионта.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Аналгетическое действие докозагексаеновой кислоты при формировании нейропатического болевого синдрома у крыс

И.В. Манжуло*, И.В. Дюйзен

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

**igor.kov@mail.ru*

Цель: оценка особенностей антиболевого действия разных доз докозагексаеновой кислоты (ДГК) при моделировании нейропатической боли у крыс.

Материалы и методы: работа выполнена на 35 самцах крыс (300г.), нейропатический болевой синдром вызывали тугой перевязкой седалищного нерва. Животные были разделены на пять групп – «контроль», группа «боль» - с моделью нейропатической боли, группа «ДГК45» - животные с травмой, получающие ДГК в дозе 45 мг/кг, группа «ДГК4,5» - животные с травмой, получающие ДГК в дозе 4,5 мг/кг и группа «ДИК» - животные с травмой, получающие 4мг/кг диклофенака - препарат сравнения. Все препараты вводили внутримышечно в течение 2 недель после операции. Визуальный анализ и инструментальное тестирование болевого синдрома (cold-plate-тест и тест инвалидности) проводились на 5, 9, 13, 17 сутки.

Результаты: распределение нагрузки на задние конечности в тесте инвалидности у интактных животных приближается к показателю 50:50%. На 5 сутки в группе «боль» распределение веса было 72:28% в пользу интактной лапы. В этот же период животные группы «ДГК45» распределяют вес в пропорции 55,4:44,6 %, в группе «ДГК4,5» - 70,7:29,3%, а в группе «ДИК» - 66,4:33,6%. В дальнейшем у животных всех групп формируется тенденция к снижению доминирования упора на здоровую конечность, к концу эксперимента распределение веса у животных группы «боль» составляет 70,8:29,2%, в группе «ДГК45» животные полностью восстанавливают баланс распределения веса, тогда как распределение веса в группе «ДГК4,5» и «ДИК» составляет 61,4:38,6% и 56,6:43,4% соответственно. Холодовая аллодиния (признак нейропатического болевого синдрома) в группе «боль» возникала на 5 сутки, резко нарастала к 9-13 суткам и снижалась к 17 суткам наблюдения. В группе «ДГК45» незначительная аллодиния формировалась к 9 суткам и не изменялась по интенсивности, тогда как у животных группы «ДГК4,5» аллодиния отсутствовала. В группе «ДИК» признаки аллодинии возникали уже на 5 сутки, нарастая к 13-17 дню. У 60% крыс группы «боль» были выявлены трофические повреждения стопы и явления аутономии; у животных групп «ДГК45», «ДГК4,5» и «ДИК» патологических изменений не наблюдалось.

Выводы: перевязка седалищного нерва сопровождается развитием нейропатического болевого синдрома – снижается порог температурной болевой чувствительности, формируется неравномерное распределение веса на задние конечности, возникают дистрофические нарушения в тканях стопы. ДГК дозо-зависимо (и в большей мере, чем препарат сравнения диклофенак) снижает активность и сроки реализации нейрогенного болевого синдрома, препятствуя развитию дистрофических изменений в тканях стопы.

Ультразвуковая экстракция флавоноидов *Scutellaria baicalensis* Georgi

А.Ю. Маняхин, Л.И. Моисеенко

Горнотаёжная станция, Дальневосточное отделение РАН, п. Горнотаёжное, Россия

Как показывают многочисленные исследования из природного сырья растительного и животного происхождения можно извлекать практически все известные соединения. Выход готовой продукции при УЗ экстрагировании в значительной степени зависит от параметров озвучивания: соотношения сырья и экстрагента и значения интенсивности УЗ. Практический опыт использования УЗ для извлечения биологически активных веществ из растений подтверждает его экономическую выгоду по сравнению с другими способами в отношении сокращения времени процесса на 1-2 порядка и увеличения выхода целевых веществ. Учитывая вышесказанное и предшествующие исследования по определению оптимальных параметров экстракции сырья *S. baicalensis*, нами были установлены параметры ультразвуковой экстракции изучаемого сырья: степень измельчения - 0,5 – 1 мм; тип экстрагента - очищенная вода; соотношение сырье: экстрагент - 1:20; температура экстракции - 40-50° С; время экстракции – 30 - 40 мин. Существенное превышение времени озвучивания (1 час и более) не повышает выход действующих веществ, но заметно влияет на их стабильность вследствие действия на них кавитационных процессов.

После завершения времени звукового воздействия, полученные экстракты высушивали на сублимационной сушке и определяли качественный и количественный состав методом ВЭЖХ. Как показал анализ экстракт содержит 16% целевого вещества – байкалина, что превышает стандартные требования к качеству - до 10 %, полный набор минорных флавоноидов суммарно равен 11,9 % и общая сумма флавоноидов составляет 27,9%. Масса сухого экстракта (сумма экстрактивных веществ), полученная из 30 г сырья, равна 12,81 г, это составляет 42,7 % от взятой для экстрагирования навески, что превосходит стандартные требования по извлечению не менее 30 % экстрактивных веществ. В варианте сорокаминутного воздействия ультразвука, наблюдается некоторое снижение выхода минорных флавоноидов, в частности: скутеллярина, вогонина-7-G, байкалеина, что, возможно, объясняется действием кавитации. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности данного метода экстракции, бесспорным преимуществом которого является существенное снижение времени экстракции с 4 часов до 40–60 минут, сырье *S.baicalensis* интродуцированного на юге Приморского края, содержит достаточное количество целевых соединений (флавоноидов) и пригодно для создания высокотехнологичных концентратов.

Биологическая активность и жирнокислотный состав глицерогликолипидов морских водорослей дальневосточных морей

Е.А. Мартыяс*, Н.И. Герасименко, Н.Г. Бусарова, С.В. Логвинов, М.М. Анисимов
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.
Владивосток, Россия
* martyuas@mail.ru

Морские водоросли являются перспективным источником для получения структурно разнообразных веществ, обладающих широким спектром биологических активностей. В последние годы за рубежом интенсивно исследуется биологическая активность липидов (глицерогликолипидов (ГЛ) и моноглицеридов), а также фотосинтетических пигментов (фукоксантина, астаксантина и др. каротиноидов). Липиды морских водорослей обладают широким спектром биологического действия, таким как – противомикробное, антивирусное, цитотоксическое, противоопухолевое и др. Водоросли дальневосточных морей практически не изучены в этом плане. Цель работы – изучить биологическую активность ГЛ из двух видов красных водорослей: *Tichocarpus crinitus* и *Neorhodomela larix* и четырех видов бурых водорослей: *Saccharina cichorioides*, *Fucus evanescens*, *Eualaria fistulosa* и *Sargassum pallidum* и охарактеризовать их жирнокислотный состав.

Из двух видов красных водорослей: *T. crinitus* и *N. larix* и четырех видов бурых водорослей: *S. cichorioides*, *F. evanescens*, *E. fistulosa* и *S. pallidum* были выделены: моногалактозилдиацилглицерины (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерины (ДГДГ), сульфохиновозилдиацилглицерины (СХДГ). Противомикробную активность определяли, используя микроорганизмы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* (ТИБОХ ДВО РАН), гемолитическую – на суспензии эритроцитов крови мышей при нейтральном и слабнокислом значении pH, цитотоксическую – на спленоцитах мышей и на клетках карциномы Эрлиха.

Мы предположили, что активность разных классов ГЛ может определяться как структурой их гликозидной части, так и составом жирных кислот (ЖК). Данные ЯМР показали, что структуры гликозидной части МГДГ из разных видов водорослей, как и структуры полярных головок ДГДГ и СХДГ идентичны у исследованных нами водорослей. Большей биологической активностью обладали МГДГ, имеющие в своем составе один сахар (галактозу). Показано, что самая высокая противомикробная активность в отношении *S. aureus* и *C. albicans*, была характерна для МГДГ из бурых водорослей *F. evanescens* и *E. fistulosa*. Также было обнаружено, что МГДГ из *E. fistulosa* обладают цитотоксической активностью в отношении клеток карциномы Эрлиха в достаточно низкой концентрации ($ED_{50}=7,3$ мкг/мл), при этом не показывают высокой токсичности в отношении нормальных клеток теплокровных животных. ДГДГ и СХДГ из морских водорослей в значительно меньшей степени ингибировали рост тестовых штаммов микроорганизмов, по сравнению с ингибирующим действием МГДГ. Гемолитическая активность была показана для ДГДГ, выделенных из бурых водорослей *E. fistulosa*, *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. pallidum*. ДГДГ из *E. fistulosa* вызывали 50% гибель клеток опухоли в концентрации 8 мкг/мл, при этом, не проявляя высокой токсичности в отношении нормальных клеток. Значимая гемолитическая активность была отмечена для СХДГ из бурых водорослей *S. cichorioides* и *S. pallidum*. Цитотоксической активностью в отношении спленоцитов мышей обладали только СХДГ из *F. evanescens*. СХДГ из *T. crinitus* оказывали цитотоксическое действие на клетки карциномы Эрлиха. Очевидно, что на биологическую активность ГЛ оказывают влияние ЖК, входящие в их состав. Исследование состава ЖК отдельных классов ГЛ из указанных водорослей показало его существенные различия. Полученные нами данные важны для дальнейшего

изучения механизма действия ГЛ из водорослей на мембраны клеток и являются перспективными в плане исследований «структура-активность».

Фенология колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) в Приморском крае.

Н.В. Мацишина

ГНУ Дальневосточный НИИ защиты растений Россельхозакадемии, п. Камень-Рыболов, Россия

Колорадский жук зарекомендовал себя как опасный вредитель картофеля. Впервые инвазия колорадского жука на Дальний Восток отмечена в 2000 г. Ранее считалось, что в условиях Приморского края этот вид акклиматизироваться не сможет из-за суровой зимы (Власова, 1978). Однако к 2007 г. вредитель заселил площадь 1147 га в 7 районах края (Мацишина, 2009). В связи с этим возникла необходимость изучения биологии и экологии колорадского жука на юге Дальнего Востока РФ. Цель настоящей работы – изучение фенологии колорадского жука в условиях муссонного климата.

Изучение фенологии колорадского жука в естественных условиях проведено в селе Ивановка в 2008-2011 гг. на стационарном участке общей площадью 720,3 кв. м, засаженным картофелем сорта Адретта. Отмечались сроки активизации перезимовавших имаго, начало и конец откладки ими яиц, сроки развития личинок, куколок, лёт нового поколения (Шапиро и др., 1989)

По среднемноголетним данным, в Приморском крае выход первых перезимовавших жуков отмечается в третьей декаде мая, а интенсивное отрождение начинается при прогревании воздуха до +20 °С и выше, и продолжается, как правило, в течение 6-9 дней

Период яйцекладки жука длится до середины августа. Интенсивность яйцекладки зависит от температуры. Холодная погода со средней температурой +18 °С заметно тормозит откладку яиц. Самки первой генерации откладывают яйца, из которых развивается второе поколение фитофага, которое в Приморском крае не успевает закончить свое развитие (2008-2009 и 2011 гг.). В 2010 г. отмечено полное второе поколение колорадского жука, чему способствовали высокие летние температуры. В Приморском крае фенология колорадского жука связана со сроками вегетации картофеля. Начало выхода перезимовавших имаго происходит в фазы «образование листьев и стеблей» и «рост растений в длину», а в отдельные годы – до всходов картофеля. Массовый выход имаго происходит в фазы «рост растений в длину» и «смыкание рядков», а первые яйцекладки зафиксированы в фенофазы «всходы-смыкание рядков». Уход в диапаузу наблюдается в фенофазу «ягодообразование – усыхание куста» в конце августа.

Исследование влияния кукумариозида А₂-2 на мультилекарственную устойчивость опухолевых клеток

Е.С. Менчинская^{1*}, Т.Ю. Горпенченко², Д.Л. Аминин¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, Владивосток, Россия

*ekaterinamenchinskaya@gmail.com

Установлено, что важнейшей причиной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток является пониженное накопление цитостатиков в клетке, обусловленное активным выведением веществ во внеклеточную среду посредством Р-гликопротеина, белка плазматической мембраны, за счет энергии гидролиза АТФ. Недавно было обнаружено, что созданный в ТИБОХ ДВО РАН иммуностимулирующий препарат Кумазид обладает выраженным противоопухолевым действием *in vivo* и проявляет синергизм при сочетанном действии с известными цитостатиками. Целью настоящей работы являлось исследование влияния тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2, составляющего основу препарата Кумазид, на резистентность опухолевых клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) к накоплению цитоплазматического зонда Calcein AM и цитостатика доксорубин.

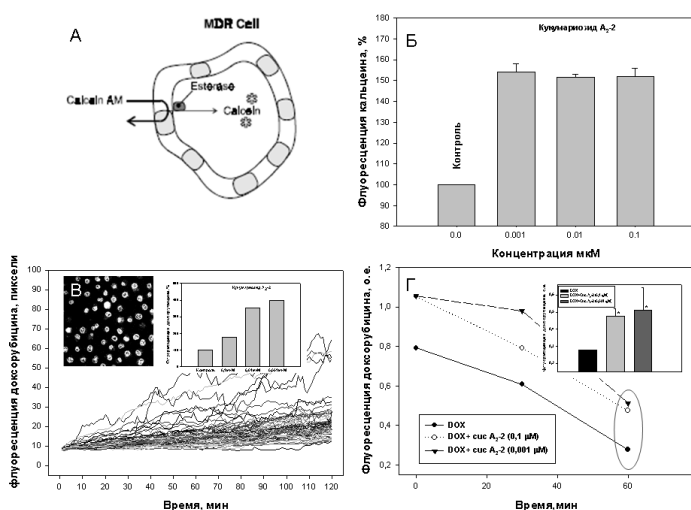


Рис. 1. Механизм возникновения МЛУ в клетках (А) и влияние кукумариозида А₂-2 на накопление зонда Calcein AM (Б) и доксорубина (В,Г) в клетках асцитной карциномы Эрлиха.

В исследовании применялась техника молекулярных флуоресцентных зондов, спектрофлуориметрия и конфокальная микроскопия. Кукумариозид А₂-2 был получен и любезно предоставлен сотрудниками ЛХМПС ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. Авиловым С.А. и к.х.н Сильченко А.С.

Показано, что в нецитотоксическом диапазоне концентраций кукумариозид А₂-2 блокирует функцию Р-гликопротеина клеток АКЭ и усиливает накопление зонда Calcein AM в цитоплазме. В концентрации 0,001 мкМ гликозид увеличивает флуоресценцию зонда в цитоплазме на 56% по сравнению с контролем (Рис.1А,Б). С помощью конфокальной микроскопии продемонстрировано, что инкубирование АКЭ с кукумариозидом А₂-2 в концентрации 0,001-0,1 мкМ в течение 2 часов приводит к заметному усилению динамики накопления доксорубина в ядрах опухолевых клеток. В этом же диапазоне концентраций гликозид существенно ингибирует выброс доксорубина из опухолевых клеток (Рис.1В, Г).

Состав и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли *Eisenia bicyclis* (Ю. Корея)

Р.В. Меньшова^{1*}, С.П. Ермакова¹, В.Н. Ум², Т.Н. Звягинцева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

²Korea Institute of Science and Technology Gangneung Institute, Gangneung 210-340, Korea.

* Menshova-R@yandex.ru

Водоросли относятся к одним из наиболее урожайных растений на Земле и издавна используются в быту и промышленности благодаря своим ценным пищевым и лечебным свойствам. Они являются источником биологически активных полисахаридов: альгиновых кислот, ламинаранов и фукоиданов. Эти соединения обладают широким спектром биологической активности и низкой токсичностью для организма [1-3].

Для установления связи «структура – биологическое действие», стандартизации выделяемых полисахаридов и создания лекарственных препаратов на их основе необходимо решать проблемы, связанные с многообразием состава полисахаридных композиций в различных источниках, выделением отдельных полисахаридов и установлением их структуры.

Цель данной работы - выделение биологически активных полисахаридов бурой водоросли *Eisenia bicyclis* и исследование их состава и структурных характеристик с использованием химических и физико-химических методов.

Нами была разработана комплексная схема выделения из бурой водоросли *E. bicyclis* альгинатов, ламинаранов и фукоиданов, включающая сочетание экстракций растворителями, растворами соляной кислоты и карбоната натрия, концентрирование, диализ, осаждение полисахаридов этанолом, разделение на DEAE-целлюлозе и гидрофобную хроматографию на Полихrome-1.

Изучена композиция полисахаридов исследуемой водоросли. Основным полисахаридом является альгинат (15.8% от веса обезжиренной водоросли), содержание водорастворимых полисахаридов составляет около 3%: количество ламинарана – 1.4% от веса обезжиренной водоросли, фукоидана - 1.3%. Показано, что альгинат является типичным представителем своего класса и характеризуется соотношением M/G = 2.2. Показано, что водоросль продуцирует ламинаран (1,3;1,6-β-D-глюкан) уникальной структуры с высоким содержанием 1,6-связей (соотношение 1,3:1,6 = 1.5:1) и молекулярной массой (19-27 кДа), более чем в 4 раза превосходящей характерную для ламинаранов. Ламинаран высокой молекулярной массы выделен впервые. Фракции фукоиданов из *E. bicyclis* представляют собой сульфатированные гетерополисахариды, различающиеся по степени сульфатирования, ацетилирования и моносахаридному составу. Исследование моносахаридного состава фукоиданов показало, что они являются галактофуканами, содержащими также минорные количества маннозы, ксилозы, рамнозы и глюкозы.

Полученная информация позволяет сделать вывод о целесообразности использования данных водорослей как нового источника для промышленного получения альгиновых кислот, а также водорастворимых полисахаридов (ламинаранов и фукоиданов), представляющих интерес как соединения необычной структуры, обладающие широким спектром биологического действия.

1. Усов, А.И. // Усп. химии, 1999, 68, Р. 1051–1061.

2. Звягинцева, Т.Н., Широкова, Н.И., Елякова, Л.А. // Биоорганическая химия, 1994, 20, Р. 349-1358.

3. Kusaykin, M.I., Bakunina, I.Yu., Sova, V.V., Ermakova, S.P., Kuznetsova, T.S., Besednova, N.N., Zaporozhets, T.S. Zvyagintseva., T.N. // Biotechnol. J., 2008, 3, Р. 904-915.

Влияние различных белковых и углеводных субстратов на дифференцировку, адгезию и пролиферацию нейральных стволовых клеток головного мозга эмбрионов крыс в культуре

П.В. Мищенко*, Н.Е. Зюмченко

Кафедра клеточной биологии и генетики, Школа естественных наук, Дальневосточный Федеральный университет, г. Владивосток, Россия

**xpolli@mail.ru*

В настоящее время одной из интереснейших и важных аспектов в научной и медицинской сфере является проблема изучения стволовых клеток. Они были открыты сравнительно недавно. И дают человечеству огромные возможности в медицине и науке. Но не все линии стволовых клеток изучены достаточно хорошо. Так, например, остается открытым вопрос для нервных стволовых клеток, которые в будущем могут дать бесценный материал, особенно для лечения ЦНС и травм, с ней связанных. Одной из интересных проблем, решение которой позволит получить полную картину поведения данных клеток, является изучение их адгезии и влияния различных субстратов на их дифференцировку и пролиферацию, что может лечь в основу управляемой дифференцировки. Поэтому правильный подбор субстрата – очень важный критерий.

В данной работе, помимо известных и распространенных субстратов, таких как коллаген, разных типов, были впервые использованы Амассин и Мезоглеин, выделенные из морских ежей и медуз соответственно, уникальность таких белков состоит в том, что они имеют аналоговые домены белков млекопитающих, которые влияют на адгезию, пролиферацию и дифференцировку нервных клеток. Исходя из этого, целью данной работы является исследование влияния различных белковых и углеводных субстратов на дифференцировку, адгезию и пролиферацию нейральных стволовых клеток головного мозга крыс в культуре. Для достижения цели, были поставлены следующие задачи: просчитать количество клеток, прикрепившихся к белковым и углеводным субстратам на различных сроках после начала культивирования (1 час, 3 часа, 6 часов, 12 часов); выявить соотношение количества пролиферирующих нервных клеток к общему числу клеток на различных белковых (коллаген I и IV типов, мезоглеин, амассин) и углеводных (пектины разной степени этерификации) субстратах на разных сроках культивирования (1 час, 3 часа, 6 часов, 12 часов); на основе полученных данных показать зависимость степени адгезии, пролиферации и дифференцировки нейральных стволовых клеток головного мозга эмбрионов крыс от используемых для культивирования субстратов.

Для постановки эксперимента взяли нервные ткани головного мозга эмбрионов крыс линии Wistar, обонятельные луковицы и кору головного мозга. Клетки культивировали и наблюдали за их ростом и дифференцировкой в течении двух недель. Для постановки эксперимента на покровные стекла, помещенные в 24-луночные планшеты были нанесены приготовленные белковые (Амассин, Коллаген IV, Коллаген I, Мезоглеин) и углеводные (пектины с различной степенью этерификации) матрицы, на которые высаживались клетки. Материал фиксировался в строго определенное время: 1, 3, 6, 12 часов. На всех сроках был проведен подсчет адгезировавших клеток.

Для определения влияния субстратов на: эффективность роста, пролиферацию и дифференцировку клетки после фиксации окрашивали мышинными и кроличьими антителами на БДУ (синтез ДНК), тубулин бета III (нейральная дифференцировка), GFAP (глиальная дифференцировка) и нестин (нейральные стволовые клетки). Вторичные антитела были конъюгированы с Alexa 488 или 546.

В результате исследования было выяснено, что на всех белковых субстратах отмечается положительная динамика адгезии клеток до срока 6 часов. Сделано предположение, что этерификация углеводов, в данном случае пектинов, тормозит адгезию, поскольку в нашем эксперименте динамика адгезии клеток на углеводных

субстратах отрицательная, кроме одного из видов углеводного субстрата (пектин 50'). Также отмечено, что на белковые субстраты адгезирует большее количество клеток, по сравнению с углеводными субстратами.

Отработаны методики иммуногистохимического окрашивания материала. С помощью антител показана динамика синтеза ДНК на ранних сроках (БДУ), а также особенности дифференцировки клеток (нестин, тубулин, GFAP).

Работа выполнена в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, договор № 11.G34.31.0010.

Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты в модели спинальной травмы у крыс

О.С. Огурцова*, И.В. Дюйзен

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

** younola@mail.ru*

Цель: изучение нейропротекторного действия докозагексаеновой кислоты (ДГК) у крыс с моделью тяжелой спинальной травмой.

Материалы и методы: использовано 16 самцов крыс (300г) с полной перерезкой спинного мозга в области ThXII-LI. В группу «травма» включены животные с моделью спинальной травмы, в группу «ДГК» - животные с травмой, получающие ежедневно внутримышечно эмульсию ДГК в дозе 45 мг/кг (3 недели). Механизмы реализации нейропротективного действия ДГК изучали с помощью морфологических и иммуногистохимических методов выявления МВР (основной белок миелина), GFAP (маркер астроцитов) и PCNA (маркер пролиферации) через 9 недель после операции.

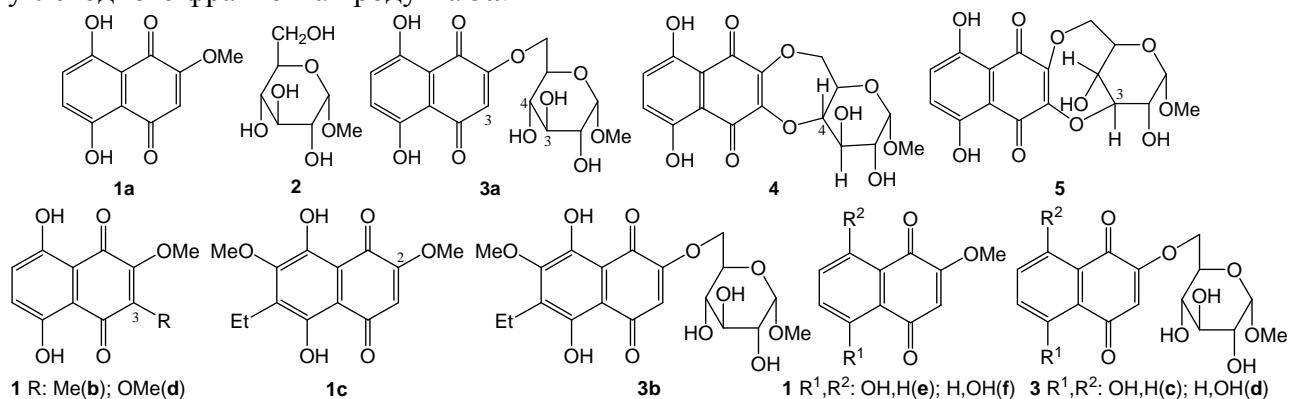
Результаты: признаки восстановления подвижности задних конечностей в группе «ДГК» наблюдались гораздо раньше (10-12 сутки), чем у животных группы «травма» (20-26 сутки). В срезах спинного мозга в группе «травма» плотная демаркационная ткань, имеет типичную геометрию и клеточный состав – глиомезодермальный рубец представлен глиоцитами и волокнами соединительной ткани, имеющими тангенциальное направление. В рубце скопление GFAP-позитивных астроцитов в виде плотных бесформенных конгломератов занимает значительную часть объема ткани (площадь окрашивания - $27,3 \pm 1,6\%$). В стенке рубца и прилежащей нервной ткани наблюдается большое количество макрофагов, указывая на продолжающийся воспалительный процесс. У животных группы «травма» фрагменты разрушенного миелина формируют обширные участки нервной ткани, окружающей послеоперационный рубец. В тканях спинного мозга крыс группы «ДГК» макрофагов мало, послеоперационный рубец представлен рыхлой тканью, прослойки которой внедряются в глубину послеоперационной кисты (на 100-150 мкм). Площадь окрашивания GFAP-позитивных элементов составляет $14,1 \pm 1,1\%$ от объема ткани. В группе «ДГК» деструкция миелина наблюдается в узкой области, прилежащей к рубцу, кроме того в составе новообразованной ткани в полости послеоперационной кисты, наблюдаются фрагменты МВР-позитивных волокон, указывая на возможность реиннервационного процесса. PCNA как маркер пролиферативной активности в группе «травма» маркировал лишь единичные глиоциты; в группе «ДГК» выявлена высокая пролиферативная активность глиоцитов белого и серого вещества спинного мозга далеко от края рубца, а также остеобластов и хондробластов поврежденных позвонков.

Выводы: введение ДГК ускоряет восстановление локомоторной активности у животных с тяжелой спинальной травмой. Выявленное действие связано с реализацией нейропротекторного действия ДГК за счет оптимизации воспалительного процесса, улучшения качественного состава рубца и усиления пролиферативной активности в тканях окружающих рубец.

Нафтохинон-углеводные конъюгаты негликозидной природы - новый тип водорастворимых производных нафтохинона. Синтез и биологическая активность

Д.Н. Пелагеев*, С.А. Дышловой, К.Л. Борисова, С.В. Драган, Н.Д. Похило
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
* pelageev@piboc.dvo.ru

Создание водорастворимых форм биоактивных хиноидных соединений является одним из направлений развиваемых в ТИБОХ ДВО РАН [1]. Широко используемым методом модификации структуры, придающей веществу растворимость, является гликозилирование. Однако, как было показано, в отличие от О гликозидов антрахинонов, соответствующие нафтохинон-углеводные конъюгаты являются относительно нестабильными [2]. Изучая реакции переэтерификации эфиров гидроксинафтазаринов, мы обнаружили, что в нее вступают лишь первичные спирты. Так, моноэфир нафтопурпурина **1a** при взаимодействии с метилглюкозидом **2**, содержащим первичную гидроксигруппу, дал конъюгат **3a** (66%). При повышенной температуре образовывалась смесь октагидропиранодиоксипина **4** и триоксабициклоундекана **5** (~1 : 2), в результате присоединения к хиноидному фрагменту спиртовых групп при С-4 и С-3, соответственно, углеводного фрагмента продукта **3a**.



Алкильный заместитель при С-3 (субстрат **1b**) препятствовал протеканию указанной реакции и в случае диметилового эфира момпаина **1c** переэтерификация шла по незатрудненной метоксигруппе при С-2, с образованием продукта **3b**. В то же время, диметилвый эфир спиназарина **1d** легко взаимодействовал с метилглюкозидом **2**, давая сложные смеси продуктов. Аналогично субстратам **1a, b, c** протекала реакция с 2-метокси- (**1e**) и 3-метокси-γ-глоном (**1f**) в результате которой образовывались, соответственно, конъюгаты **3c, d**. Все полученные продукты **3a-d** растворялись в воде (рН 7), давая стабильные растворы.

Соединения **3a-d** показали цитотоксическую активность по отношению к клеткам промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, кроме того была показана зависимость цитотоксической активности от количества и положения гидроксильных групп в нафтохиноновом ядре. Предварительные исследования показали, что присоединение углеводного остатка к молекуле нафтохинона приводит к увеличению активности в 10 раз.

1. V.Ph. Anufriev, V.L. Novikov, O.B. Maximov, G.B. Elyakov, D.O. Levitsky, A.V. Lebedev, S.M. Sadretidinov, A.V. Shvilkin, N.I. Afonskaya, M.Ya. Ruda, N.M. Cherpachenko // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 587-592.
2. С.Г. Полоник, А.М. Толкач, Н.И. Уварова // Журн. орган. химии. 1994, 30, 248-253.

Получение растений риса из клеточных культур, трансформированных геном пирролин-5-карбоксилат синтазы

С.А. Пинкус

Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
slava.bar@mail.ru

Биотические и абиотические факторы окружающей среды являются лимитирующими по отношению к росту и продуктивности растений. Засуха, засоление и низкие температуры – наиболее значимые из них, вызывающие осмотический стресс. Методы генной инженерии позволяют придавать растениям новые качества, способствующие устойчивости к неблагоприятным факторам (T.Piratpanukul et al., 2004). Одним из эффективных методов является агробактериальная трансформация – метод, позволяющий вводить в реципиент сравнительно крупную генетическую конструкцию, содержащую целевой ген, обеспечивающий устойчивость (Майсурян А.Н., 2007). Известно, что получены трансгенные растения, содержащие чужеродный ген синтеза пролина – пирролин-5-карбоксилатсинтазу (P_5CS) и обладающие повышенной способностью к продуцированию пролина (Zhu et al., 1998). Растения были устойчивыми к засухе и засолению. Работы по получению аналогичным методом холодоустойчивых растений риса не известны.

Цель настоящего исследования – получить трансгенные растения риса, экспрессирующие ген P_5CS . В качестве объекта для данного исследования был взят сорт риса Конкурент – продукт дальневосточной селекции. Для трансформации использовали *Agrobacterium tumefaciens* AGL-O, содержащую целевой ген P_5CS (NG AJ278818) под управлением 35S промотора, маркерный ген устойчивости к канамицину *nptII*. Используемый целевой ген выделен из *Medicago truncatula* и является конститутивным. Генетическая конструкция предоставлена Институтом цитологии и генетики СО РАН.

Трансгенность полученных растений риса была доказана методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ДНК, выделенной из растений, полученных из трансформированных культур со специфическими праймерами к генам P_5CS . Нативность ДНК проверяли с помощью праймеров к гену домашнего хозяйства – *Elongation factor* (NG GQ848073). Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора для синтеза обогащенной полноразмерными последовательностями двухцепочечной кДНК "Mint" (Евроген, Россия). Полученную кДНК амплифицировали с использованием праймера и полимеразы "Encyclo", входящих в состав набора "Mint" при помощи амплификатора iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA). Амплифицированную кДНК использовали в качестве положительного контроля при изучении экспрессии интересующих генов. При анализе ПЦР-РВ были использованы Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) и 2.5x SYBR green PCR master mix содержащий ROX как пассивный референсный краситель (Syntol, Russia).

В результате проведенных исследований были получены 9 растений-трансформантов риса. ПЦР-анализ полученного материала показал присутствие трансгена в двух образцах только с помощью Nest-ПЦР, что говорит о незначительной вставке гена P_5CS в геном растения, либо о низком уровне экспрессии перенесенного гена, поэтому на матрице кДНК не удалось обнаружить экспрессию ни методом ПЦР с продуктов ОТ, ни более чувствительным методом ПЦР в реальном времени.

Определение фармакокинетических свойств кукумариозида А₂-2 методом МАЛДИ масс-спектрометрии и молекулярной визуализации

Е.А. Пислягин*, П.С. Дмитренко, Д.Л. Аминин.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.

Владивосток, Россия

*pislyagin@hotmail.com

Фармакокинетические исследования являются важным этапом создания новых лекарственных препаратов. Они позволяют оценить скорости поступления и выведения биологически активных субстанций в различные органы и ткани, определить продукты метаболизма лекарственного средства, подобрать дозы и временной режим применения разрабатываемых препаратов. Созданный в ТИБОХ ДВО РАН иммуностимулирующий препарат Кумазид предназначен для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний человека. Однако фармакокинетическое поведение этого препарата в органах-мишенях до сих пор остается во многом не выясненными. Целью настоящей работы являлось определение некоторых фармакокинетических свойств тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2, составляющего основу препарата Кумазид, методами масс-спектрометрии и молекулярной визуализации. Для анализа гомогенатов ткани селезенки и исследования поверхности полученных с помощью криотома срезов селезенки использовали методы МАЛДИ-ВП-МС и МАЛДИ имаджинга в режиме отрицательных ионов. Кукумариозид А₂-2 был получен и любезно предоставлен сотрудниками ЛХМПС ТИБОХ ДВО РАН д.х.н. Авиловым С.А. и к.х.н. Сильченко А.С.

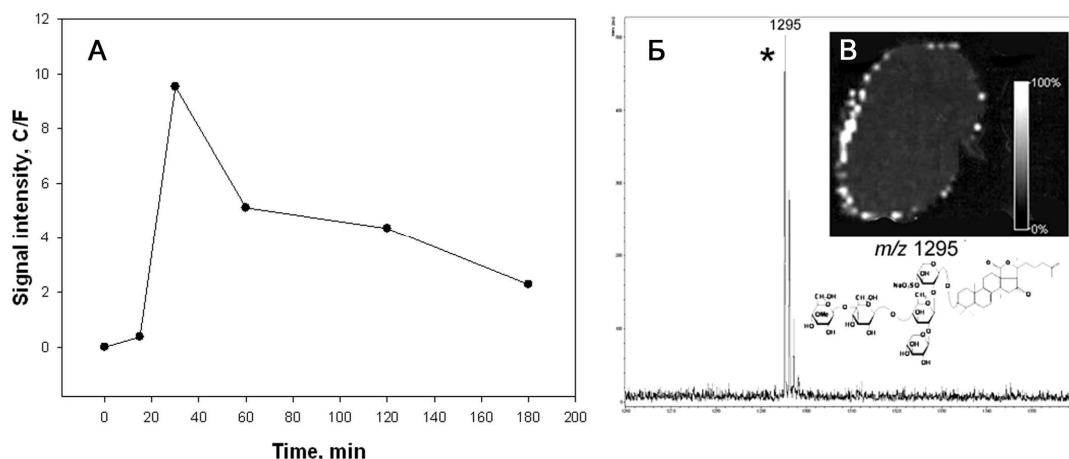


Рис. 1. Динамика изменения содержания кукумариозида А₂-2 в селезенке мыши (А); МАЛДИ масс-спектр гликозида и его распределение в ткани селезенки (Б, Г) при однократной внутривенной инъекции.

Было показано, что кукумариозид А₂-2 надежно обнаруживается с помощью МАЛДИ-МС в ткани селезенки подопытных мышей после однократного внутривенного введения в дозе 5 мг/кг. Установлено, что гликозид стабилен в ткани селезенки и практически не претерпевает метаболических превращений как при инкубировании в гомогенате ткани, так и в интактном органе после внутривенной инъекции в течение 24 часов. Обнаружено, что при однократном введении кукумариозид А₂-2 всасывался довольно быстро. Максимальная концентрация кукумариозида А₂-2 в гомогенате ткани наблюдалась в первые 30 минут после введения, минимальные значения регистрировались через 3 часа (Рис. 1А,Б). Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при исследовании фармакокинетики ³Н-кукумариозида А₂-2. Гликозид распределяется в основном в области серозной оболочки селезенки и не наблюдается внутри органа (Рис.1В). Он локализован в ткани в высокой концентрации и обнаруживается в срезах, полученных как у поверхности органа, так и из середины.

Масс-спектрометрическое изучение стероидных гликозидов из дальневосточной морской звезды *Aphelasterias japonica*

Р.С. Попов*, Н.В. Иванчина, П.С. Дмитренко

Тихоокеанский институт биорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.

Владивосток, Россия

*prs_90@mail.ru

Стероидные гликозиды морских звезд можно разделить на две основные структурные группы: астеросапонины и гликозиды полигидроксистероидов. Астеросапонины представляют собой олигогликозиды, имеющие стероидный агликон с 3 β ,6 α -диолевой группировкой, $\Delta^9(11)$ -двойной связью, сульфатной группой, при С-3 агликона и олигосахаридной цепью, имеющей от четырех до шести моносахаридных остатков при С-6. Гликозиды полигидроксистероидов представляют собой большую группу разнообразных по своему строению стероидных соединений, имеющих в агликоне от четырех до девяти гидроксильных групп и один или два моносахаридных остатка, присоединенных к стероидному ядру, к боковой цепи или одновременно к стероидному ядру и боковой цепи агликона. Стероидные гликозиды морских звезд имеют необычное химическое строение и обладают разнообразной физиологической активностью, включая противоопухолевые, противовирусные, противовоспалительные, анальгетические, гемолитические, гипотензивные, иммуномодулирующие свойства, что обуславливает интерес химиков-биооргаников к исследованию этого класса соединений.

Одним из основных методов структурных исследований морских гликозидов, наряду с методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, является метод масс-спектрометрии, преимущество которого заключается в высокой селективности, чувствительности и скорости проведения анализа. Появление новых методов масс-спектрометрии, таких как матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ), ионизация электрораспылением (ИЭР), тандемная масс-спектрометрия, значительно расширило возможности структурного исследования новых вторичных метаболитов.

Методом МАЛДИ МС нами был проведен масс-спектрометрический анализ четырех полярных фракций морской звезды *Aphelasterias japonica* с целью оценки перспективности выделения индивидуальных соединений. Выбранные для дальнейшего изучения фракции были разделены с помощью многократной ВЭЖХ на обращенной фазе, и получены индивидуальные соединения: стероидный монозид афеластерозид Е и два астеросапонины, а также суммарная фракция двух астеросапонинов и их десульфатированные производные.

С помощью ИЭР МС и МС/МС и 2D ЯМР спектроскопии было установлено, что один из полученных астеросапонинов является ранее известным соединением - астероновым аналогом офидианозида F, выделенным из морской звезды *Oreaster reticulatus* [1]. Строение нового афеластерозида Е было установлено как натриевая соль 26-О-сульфата 3-О- β -D-ксилопиранозил-5 α -холест-3 β ,5 α ,6 β ,15 α ,26-пентаола.

Был проведен подробный масс-спектрометрический анализ астеросапонины афеластерозида А-1, суммы двух астеросапонинов афеластерозидов А-2 и А-3, и их десульфатированных производных. На основании данных ИЭР МС и МС/МС и 1D ЯМР спектров соединений было определено строение их стероидных агликонов, установлены последовательности моносахаридных остатков в углеводных цепях, а также предполагаемые места присоединения моносахаридных остатков. В результате были предложены структуры афеластерозидов А-1, А-2 и А-3 и показано, что они являются новыми соединениями.

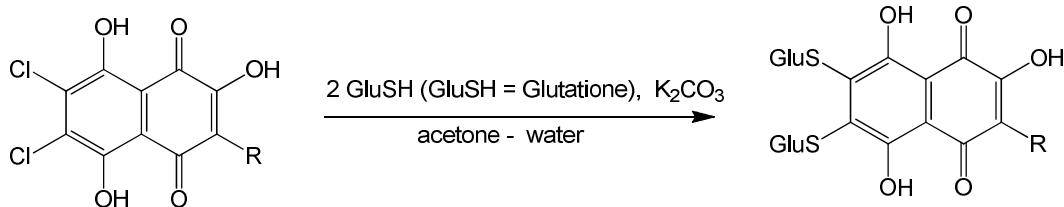
Синтез водорастворимых 6,7-диглутатионильных производных 2-гидрокси-3-алкилнафтазаринов

Ю.Е. Сабуцкий*, Н.С. Полоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

* *alixar2006@yandex.ru*

Соединения ряда 1,4-нафтохинона широко распространены в природе и проявляют разнообразную биологическую активность. Среди нафтохинонов особое место занимают производные 5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинона (нафтазарина). Характерной особенностью нафтазаринов является легкость таутомерных переходов между ароматической и хиноидной частью. Благодаря особенностям строения, соединения нафтазаринового ряда способны эффективно перехватывать свободные радикалы и связывать ионы Fe^{2+} , ответственные за образование активных форм кислорода, избыточное содержание которых в организме приводит к развитию различных патологических состояний. На основе одного из доступных соединений – пигмента морских ежей 2,3, 5,7,8-пентагидрокси-6-этил-1,4-нафтохинона (эхинохрома) в ТИБОХ ДВО РАН создан эффективный отечественный лекарственный препарат ГистохромTM [1]. При использовании данных соединений в медицинских целях, часто возникает проблема, связанная с их плохой растворимостью в воде. Одним из подходов для создания новых более растворимых биологически активных производных нафтохинонов является их конъюгирование с аминокислотами [2,3] и углеводами [5,6], которое позволяет существенно улучшить растворимость и биодоступность исходного хинона. Ануфриев и др. [2] показали, что конъюгация гидроксинафтазаринов **1**, **2** с глутатионом (GluSH) в метаноле и катализе KF с выходами 78-82% приводит к образованию новых водорастворимых нетоксичных глутатионильных аналогов эхинохрома **3**, **4**, обладающих высокими кардиопротекторными свойствами.



1 R = Me, **2** R = Et

3 R = Me (94%), **4** R = Et (88%)

В представленной работе описан улучшенный способ получения диглутатионильных производных **3**, **4** в котором, вместо токсичного метанола и реагирующего со стеклом фторида калия, реакцию конденсации глутатиона с хлорнафтазаринами **1**, **2** проводят в растворе вода–ацетон при катализе K_2CO_3 . Предложенный способ позволяет получать целевые соединения с выходами 88-94%.

1. Мищенко Н.П., Федорев С.А., Багирова В.Л. // Хим.-фарм. журнал. 2003, 37.
2. Anufriev V. Ph., Novikov V.L., Maximov O.B. et. al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 6, P. 587-592.
3. Katritzky, A., Huang, L., Sakhuja, R. // Synthesis. 2010,12, P. 2011-2016.
4. Fedorov, S. N., Shubina, L. K., Kuzmich, A. S., Polonik, S. G. // Open Glycoscience. 2011, 4, P. 1-6.
5. Полоник С.Г., Толкач А.М., Уварова Н.И. // Ж. Орг. Химии. 1994, Т.30. № 2. С. 248-253.

Исследование некоторых факторов влияющих на извлечение окрашивающих веществ из шелухи гречихи

С.А. Самотылова*, А.М. Заболотная, В.А. Реутов

Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

** samotylova.svetlana@mail.ru*

Шелуха гречихи, как показали исследования [1-3], содержит большое количество ценных органических компонентов. Для извлечения этих веществ, в существующих технологиях, используются сложные растворители или диоксид углерода. Использование воды в качестве экстрагента малоэффективно в традиционных технологиях извлечения, но существуют различные методы интенсификации, которые позволяют значительно увеличить выход экстрагируемых веществ.

Использование микроволнового нагрева в процессах извлечения позволяет эффективно, равномерно и бесконтактно нагревать реакцию смесь с меньшими временными и энергетическими затратами по сравнению с традиционными методами [4]. Применение микроволновой обработки для извлечения водорастворимых веществ из гречихи позволяет повысить содержание фенольных соединений, но не всегда приводит к повышению содержания веществ обладающих антиоксидантной активностью. Вероятнее всего это связано с деградацией фенольных соединений с антиоксидантной активностью при высокой температуре экстракции [5]. В других источниках, например в [6], показано снижение содержания фенольных и антиоксидантных веществ в экстрактах, полученных при микроволновом нагреве.

В рамках данной работы исследовали влияние длительности измельчения и хранения измельченного образца, а также температуры микроволновой обработки на извлечение окрашивающих веществ из шелухи гречихи. Окрашивающие вещества экстрагировали из шелухи гречихи в микроволновой печи СЕМ Mars X.

Предварительное измельчение материала всегда положительно влияет на процесс экстрагирования. Однако влияние степени и параметров измельчения оказывают незначительное влияние на выход экстрагируемых веществ. Мелкодисперсные суспензии, образующиеся при обработке измельченного материала, плохо разделяются фильтрованием. По результатам исследования количество веществ содержащихся в экстрагированном материале остается примерно в одном диапазоне, это означает, что длительность измельчения не оказывает существенного воздействия на количество извлекаемых веществ. Длительность периода от измельчения до начала обработки, также как и время измельчения, не оказывает большого влияния на выход веществ, однако результаты, полученные на 11-й день после измельчения, имеют более существенный разброс, чем в первые дни. Хорошо прослеживается закономерное увеличение выхода окрашенных веществ при увеличении температуры микроволновой обработки. При температурах 80 °С и 100 °С концентрация полученных растворов практически не зависит от длительности предварительной обработки, в то время как при температуре 120 °С выход продуктов уменьшается при увеличении времени предварительной обработки.

1. Земнухова, Л.А.; Колзунова, Л.Г.; Шкорина, Е.Д. // ЖПХ 2007. Т. 80, № 6, 1032-1036.
2. Земнухова, Л.А.; Исай, С.В.; Шкорина, Е.Д.; Бусарова, Н.Г. Кафанова, Т.В. // ЖПХ 2006. Т. 79, № 3, 1554-1557.
3. Туева, И.А.; Дмитрук, С.Е.; Калинин, Г.И.; Сальникова Е.Н. Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья // материалы II Всероссийской конференции 2005. Кн. I. 344-348.
4. Ванец, А.С.; Третьяков, Ю.Д. // ЖПХ 2007. Т. 76, № 5, 435-436.
5. Ingletta, G.E.; Rosea, D.J.; Chena, D.; Stevenson, D.G.; Biswas A. // Food Chem. 2010, 119, Issue 3, 1216-1219.
6. Min Zhang; Haixia Chen; Jinlei Li; Ying Pei; Yi Liang. // LWT Food Science and Technology. 2010, 43, 181-185.

Структурные исследования нанокompозитных пленок на основе хитозана и неорганических наночастиц глины

С.А. Сарин^{1*}, Ю.А. Щипунов^{1,2}

¹ Институт химии, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

² The WCU Center for Synthetic Polymer Bioconjugate Hybrid Materials, Division of Chemical Engineering, Pusan National University, San 30, Jangjun Dong, Geumjung Gu, Busan, Korea

* zveroboy82@gmail.com

Бионанокompозиты на основе хитозана и наноразмерных частиц глин являются перспективными материалами во многих отраслях промышленности, благодаря своим уникальным свойствам [1]. Введение наночастиц в биополимеры в первую очередь имеет целью увеличение их механической прочности, но оно также приводит к снижению горючести и газопроницаемости [2-4]. Кроме того, бионанокompозиты имеют еще одно достоинство, отличающее их от полимер-неорганических нанокompозитов, которое заключается в биоразлагаемости и отсутствии токсичности.

Оригинальный метод получения гомогенно-однородных бионанокompозитных материалов предложен в Институте Химии ДВО РАН [5]. Он основан на свойстве хитозана заряжаться только при $pH < 6,3$. При этом внесение дисперсии незаряженного хитозана в раствор наночастиц сапонита, pH которого больше pK , а затем медленное подкисление раствора с помощью подкисляющего агента позволяет регулировать процесс комплексообразования. В результате возникает монолитный, механически прочный гидрогель. Высушивание гидрогеля позволяет получить пленочные биосовместимые нанокompозитные материалы. Исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии, малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и динамического термомеханического анализа (ДТМА) показывают, что при стехиометрическом соотношении концентраций противоположно заряженных хитозана и наночастиц глины достигается формирование структурно упорядоченных бионанокompозитов, которые по своей структуре имеют сходство с природными системами.

Целью работы является детальное исследование формирования, структурной организации и свойств бионанокompозитных материалов из хитозана с наночастицами глины – сапонита.

Методом МУРР установлено, что наночастицы сапонита в процессе самоорганизации формируют слоистую упорядоченную структуру, при этом хитозан выступает в качестве «склеивающего» материала, проникая между частицами глины. Методами ДТМА и МУРР установлено, что хитозан, в зависимости от соотношения компонентов, формирует моно- или бимолекулярный слой между наночастицами сапонита. При стехиометрическом соотношении концентраций противоположно заряженных хитозана и наночастиц глины достигается формирование кристаллических слоев полимера. Подобные системы отличаются высокими механическими характеристиками, а так же устойчивостью к набуханию в воде, что позволяет их применять в качестве прочных и долговечных, биосовместимых покрытий способных к биоразложению.

1. Rhim J.W. and Ng P.K.W. Critical Reviews in Food Science and Nutrition - 2007. - V.47, № 4. - P. 411-433.
2. Yi H., Wu L.Q., Bentley W.E., Ghodssi R., et al. Biomacromolecules - 2005. - V.6, № 6. - P. 2881-2894.
3. Darder M., Aranda P., and Ruiz-Hitzky E. Advanced Materials - 2007. - V.19, № 10. - P. 1309-1319.
4. Ruiz-Hitzky E. and Van Meerbeek A. Handbook of Clay Science.. Elsevier. - 2006. - P. 583 - 621.
5. Shchipunov Y., Ivanova N., and Silant'ev V. Green Chemistry - 2009. - V.11, № 11. - P. 1758-1761.

Выделение, рефолдинг и иммунохимические свойства мутантных OmpF поринов *Yersinia pseudotuberculosis* с делециями наружных петель

О.В. Сидорова*, Д.К. Чистюлин

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.

Владивосток, Россия

*olga_ximik@mail.ru

С помощью сайт-направленного мутагенеза рекомбинантной плазмиды, несущей ген *ompF* *Yersinia pseudotuberculosis*, были получены гены мутантных OmpF поринов с делециями наружных петель L1, L6 и L8 (**del 1**, **del 6** и **del 8**). Структурно-функциональная характеристика и иммунобиологические свойства полноструктурного рекомбинантного OmpF белка были исследованы ранее.

Мутантные белки экспрессировали в клетках штамма Rosetta *Escherichia coli* (Novagen, США) и выделяли из телец включения. В результате рефолдинга, проведенного при помощи диализа и ионообменной хроматографии, были получены олигомерные формы (тримеры) мутантных белков. С помощью методов оптической спектроскопии (кругового дихроизма и собственной белковой флуоресценции) показано, что мутантные белки отличаются от полноструктурного рекомбинантного порина пространственной структурой как на уровне вторичной, так и третичной структуры. С помощью техники бислойных липидных мембран установлено, что отсутствие петель L1, L6 и L8 не влияет на уровень наиболее вероятной проводимости каналов OmpF порина псевдотуберкулезного микроба.

Для характеристики иммунохимических свойств мутантных поринов были получены иммунные сыворотки к **del 1**, **del 6** и **del 8** с рабочим разведением 1/6400 и 1/12800 (в результате 3-кратной иммунизации мышей линии BALB/c, 100 мкг/мышь). Степень иммуногенности мутантных поринов оказалась различной. Отсутствие петли L8 в структуре белка не сказывалось на его иммуногенности по сравнению с таковой полноструктурного рекомбинантного порина. Наименее иммуногенным оказался порин **del 1**, наиболее – **del 4** и **del 6**.

Согласно данным иммуноблоттинга и ИФА, отсутствие петель L1, L6 и L8 изменяет антигенную структуру мутантных поринов. Кроме того, результаты взаимодействия рекомбинантных OmpF поринов (полноразмерного и мутантных) с антителами к нативному белку свидетельствуют о том, что отсутствие вышеуказанных петель по-разному влияет на формирование иммунного ответа. Полнота взаимодействия мутантных поринов с антителами к нативному белку составила 56-73% по сравнению с полноструктурным рекомбинантным порином (взаимодействие с которым принимали за 100 %). Наименьшее связывание (56-57%) наблюдалось для порина **del 1**, наибольшее – для поринов **del 6** и **del 8** (73%). Таким образом, петлю L1 можно считать одним из иммунодоминантных поверхностных эпитопов OmpF порина псевдотуберкулезного микроба.

Работа поддержана грантом ДВО РАН № 12-III-B-05018 «Мутантные OmpF порины *Yersinia pseudotuberculosis* с делециями наружных петель: создание генетических конструкций, экспрессия, выделение, рефолдинг» по разделу «Фундаментальные исследования молодых ученых».

Формирование, структура и свойства нанокompозитов хитозана с наночастицами глин, полученных методом регулируемого заряжения полисахарида

В.Е. Силантьев^{1*}, И.В. Постнова², Ю.А. Щипунов¹

¹ Институт химии, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

* vladimir.silantyev@gmail.com

К нанокompозитам относят материалы, составленные из полимеров и наночастиц. Их интенсивные исследования ведутся с 1993 года после обнаружения значительного увеличения механической прочности нейлона при добавлении 3-5 мас. % наночастиц глин [1]. Нанокompозиты на основе биополимеров относят к группе бионанокompозитов, поскольку они отличаются методами получения, свойствами и областями применения.

В докладе представлены результаты исследования бионанокompозитных гидрогелей, формируемых на основе хитозана по методу, предложенному в работе [2]. Хитозан является полисахаридом, получаемым диацетилизацией хитина – основного компонента покрова ракообразных. Повышенный интерес к нему обусловлен разнообразными видами биологической активности. К числу особенностей хитозана относится заряд макромолекулы. Он является единственным природным катионным полиэлектролитом. Предложенные методы получения бионанокompозитных материалов достаточно часто основываются на формировании полиэлектролитных комплексов противоположно заряженными компонентами. Однако быстрое кооперативное связывание приводит к выпадению гетерогенных осадков. Эффект наноразмерных компонентов, как было показано в работе [1], проявляется только в том случае, если они равномерно распределены в матрице полимера.

В предложенном методе гомогенное распределение наночастиц и макромолекул хитозана в бионанокompозите достигается за счет самоорганизации, регулируемой постепенным зарядением полисахарида. В качестве неорганической составляющей используется синтетическая глина сапонит. Она легко диспергируется в водных растворах в виде отдельных наночастиц при перемешивании на магнитной мешалке. Хитозан относится к числу слабых полиэлектролитов. Он переходит в заряженное состояние при $\text{pH} \leq \text{pK}_a$, равный 6,3. Постепенное подкисление раствора осуществляется введением глюколактона, который в водных растворах медленно гидролизует с образованием глюконовой кислоты. Полисахарид электростатически связывается с поверхностью отрицательно заряженных наноразмерных частиц глины по мере присоединения протонов к аминогруппам. При таком проведении процесса исключается выпадение осадка, гели получаются монолитными с гомогенно распределенными в объеме как макромолекулами полисахарида, так и наночастицами глины.

Проведено изучение фазового поведения в системе хитозан-сапонит-вода и определены условия получения гомогенных гидрогелей. Их механические свойства исследованы методом динамической реологии. Показано [2], что введение даже небольших количеств полисахарида в раствор сапонита приводят к желированию и резкому увеличению механической прочности гидрогелей. Установлено с помощью сканирующей электронной микроскопии, что механические свойства полученных композитов являются результатом регулируемых взаимодействий хитозана и наночастиц сапонита, приводящих к самоорганизации и формированию фибриллярной сетчатой структуры.

1. Kojima, Y., et al. // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 1993, 31, 983-986.

2. Shchipunov, Yu.; Ivanova, N.; Silant'ev, V. // Green Chemistry, 2009, 11, 1758-1761.

Выделение и изучение ингибиторов протеиназ из актинии *Heteractis magnifica*

О.В. Синцова^{1*}, И.Н. Гладких², Е.В. Лейченко², М.М. Монастырная², Э.П. Козловская²
¹ Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия
² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
*sintsova0@mail.ru

Актинии являются богатейшим источником биологически активных полипептидов. В состав их ядовитого секрета входят высокоспецифичные нейротоксины, актинопорины, протеолитические ферменты и ингибиторы протеиназ. Интерес исследователей к ингибиторам протеиназ актиний обусловлен их способностью блокировать активность протеиназ разных классов, проявлять антигистаминную, противовоспалительную активности, ингибировать Kv-каналы и болевые ваниллоидные TRPV1-рецепторы [1]. Разнообразие фармакологических свойств делает их чрезвычайно ценными соединениями для исследования белок-белковых взаимодействий, изучения структуры и механизма функционирования ионных каналов, и, в перспективе, для создания новых медицинских препаратов, действующих на различные биологические мишени. Поэтому поиск новых актиний-продуцентов ингибиторов протеиназ является актуальной задачей.

В данной работе впервые описано выделение и физико-химические характеристики ингибиторов протеиназ тропической актинии *Heteractis magnifica*, для которой, установлено наличие мультигенного семейства актинопоринов [2] (три из них выделено в нативном состоянии) и одного нейротоксина Kv1.2-канала [3].

В результате выделения ингибиторов протеиназ из яда щупалец *H. magnifica* по схеме, включающей гидрофобную хроматографию на полихrome-1, жидкостную гель-хроматографию умеренного давления на колонке Superdex™ Peptide 10/30 и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈, получено два высокоочищенных полипептида, НМ1 и НМ2, молекулярная масса которых по данным MALDI-TOF MS (6086,0 и 6116,3 Да) оказалась близка массам полипептидов мультигенного семейства Кунитц-типа актинии *Heteractis crispa* [4]. Для определения N-концевой аминокислотной последовательности НМ1 и НМ2 проводили восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом и алкилирование образовавшихся сульфгидрильных групп 4-винилпиридином. В результате разделения реакционной смеси с помощью ВЭЖХ были получены модифицированные полипептиды с молекулярной массой 6716,0 и 6746,3 Да, что свидетельствовало о восстановлении трех дисульфидных связей в молекулах ингибиторов. Определена последовательность N-концевого фрагмента НМ2 (GSICLERPKVVGPRCTAYFPRFYFDSE), которая идентична последовательности N-концевых фрагментов нативных GS-ингибиторов InhVJ, Jn-IV и анальгетических полипептидов АРНС 1-2 [4] из *H. crispa*.

В дальнейшем планируется получить и исследовать полные аминокислотные последовательности полипептидов НМ1 и НМ2 для возможного практического применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» 12-И-П6-10.

1. Gladkikh I.; Monastyrnaya M.; Leychenko E.; Zelepuga E.; Chausova V.; Isaeva M.; Anastyuk S.; Andreev Y.; Peigneur S.; Tytgat J.; Kozlovskaya E. // Mar. Drugs. 2012, 10, 1545-1565
2. Wang Y.; Yap L.L.; Chua K.L.; Khoo H.E. // Toxicon. 2008, 51, 1374-1382.
3. Gendeh G.S.; Young L.C.; de Medeiros C.L.; Jeyaseelan K.; Harvey A.L.; Chung M.C. // Toxicon. 2000, 38, 259-264.
4. Isaeva M.P.; Chausova V.E.; Zelepuga E.A.; Guzev K.V.; Tabakmakher V.M.; Monastyrnaya M.M.; Kozlovskaya E.P. // Peptides. 2012, 34, 88 - 97.

Исследование эффективности использования в комплексной терапии левокарнитина и виферона у детей, которые болеют острой пневмонией

А.А. Сколубович*, З. Шарифова

Амурская государственная медицинская академия, г. Благовещенск, Россия

**Anns-90@mail.ru*

Наличие фоновой патологии у тех, кто поступает в стационар с пневмонией, требует проведения адекватной терапии. Особую значимость в решении проблемы приобретают вопросы повышения резервных возможностей организма и поиск эффективных и безопасных препаратов.

Основную группу и группу сравнения составили дети первого года жизни (пониженного питания I-II степени).

Дети с диагнозом пневмонии были разделены на три группы. Первая группа - дети, получавшие терапию L-Karnithini, 2 группа - L-Карнитином и Вифероном, 3 группа - указанная коррекция (иммуномодулирующая и метаболическая) не проводилась.

Группы были сопоставимы по основным характеристикам: полу, возрасту, степени тяжести, клиническому течению пневмонии, биохимическим показателям, наличию сопутствующей или фоновой патологии, а также проводимой терапии. Динамику воспалительного процесса легких оценивали комплексно с учетом клинической картины, динамики температуры тела, лабораторных показателей. Таким образом, исследования подтвердили эффективность применения вышеуказанных препаратов при лечении пневмонии у детей. Это позволило изменить течение воспалительного процесса, что способствовало улучшению, приводя к более быстрой ликвидации симптомов.

Метаболиты из морского изолята гриба *Aspergillus versicolor* КММ 4644

М. П. Соболевская^{1*}, Ш. Ш. Афиятулло¹, С. А. Дышловой¹, Н. Н. Киричук¹,
В. А. Денисенко¹, Н. Ю. Ким¹, А. А. Бочарова².

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

* sobolevskaya_m@mail.ru

Из морского изолята гриба *Aspergillus versicolor* КММ 4644 (Сахалинский залив, Охотское море) выделены *эпи*-дезоксибревианамид **1**, декумбеноны **2** и **3**, диорцинол (**4**) и стеригматоцистин (**5**) (Рис.1). Структуры соединений установлены на основании данных спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии. Исследовано цитотоксическое действие *эпи*-дезоксибревианамида **1** и стеригматоцистина (**5**) в отношении опухолевых клеток: рака шейки матки человека (HeLa) и лейкемии человека (промиелоциты) (HL-60) с использованием MTS-реагента. Показано, что *эпи*-дезоксибревианамид **1** проявляет слабый ингибирующий эффект на рост клеток HL-60 (ИК₅₀ 88.9 мкМ). Стеригматоцистин (**5**) показывает слабое действие в отношении опухолевых клеток HeLa и HL-60 (ИК₅₀ 117.5 мкМ и 46.7 мкМ, соответственно). Изучено также действие соединений **1** и **5** на формирование и рост колоний клеток HeLa с помощью метода мягкого агара (неопластическая трансформация клеток). Показано, что *эпи*-дезоксибревианамид **1** и стеригматоцистин (**5**) ингибируют рост колоний этих клеток на 50% при концентрациях 28.4 мкМ и 0.5 мкМ, соответственно.

Эпи-дезоксибревианамид **1** и декумбеноны **2** и **3** впервые описаны как метаболиты факультативного морского гриба *Aspergillus versicolor*.

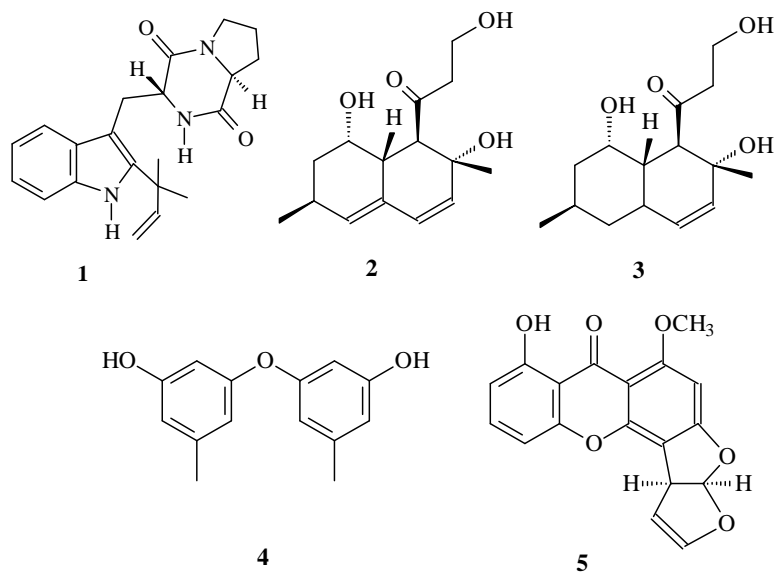


Рис.1. 1-5 Метаболиты из морского изолята гриба *Aspergillus versicolor* КММ 4644.

Работа поддержана грантами Президиума ДВО РАН № 12-III-B-05-073, № 12-III-B-06-110, “Молекулярная и клеточная биология” № 12-I-П6-11, грантом президента РФ “научная школа № 546.2012.4” и грантом РФФИ № 11-04-00772-а.

Реорганизации клеток внутренней массы бластоцисты мыши в процессе их развития в условиях *in vivo* и *in vitro*

Л.А. Сульдина^{1,2*}, Е.Ю. Короткевич¹

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

*suldinalubov@gmail.com

Одной из горячих точек современных биологических исследований является изучение свойств и поведения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Полученные из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты, эти клетки способны неограниченно делиться и сохранять свойство плюрипотентности в течении длительного времени в условиях *in vitro* (Robertson, 1986, Keller, 2005). Однако, было замечено, что несмотря на общность происхождения, клетки ВКМ и ЭСК отличаются по ряду параметров. Целью настоящей работы было выявление ультраструктурных различий между этими клетками.

На начальном этапе мы исследовали динамику структурных изменений, происходящих в процессе нормального развития эмбриона мыши от стадии зиготы до бластоцисты. Было установлено, что на 4х-клеточной стадии усложняется организация ядрышек, в которых обособляются внутренний плотный и наружный сетчатый компоненты. Параллельно, в цитоплазме увеличивается количество гранулярного ЭПР. Округлые митохондрии, содержащие полость в центре и продольно ориентированные кристы, замещаются в процессе дробления зиготы на более вытянутые митохондрии с поперечными кристами. При этом вакуоль смещается к одному из концов органеллы. Электронномикроскопический анализ показал, что в клетках ВКМ бластоцисты хорошо развит шероховатый ЭПР, представленный длинными цистернами, в то время как для ЭСК характерно присутствие коротких узких цистерн. Несмотря на сходство в размерах и форме, клетки ВКМ контактируют между собой в основном посредством щелевых контактов, в то время как в колониях, формируемых ЭСК, клетки могут быть соединены друг с другом с помощью десмосом. Наибольшие различия между клетками ВКМ и ЭСК были замечены в морфологии митохондрий. В клетках ВКМ присутствуют сложные по морфологии митохондрии вытянутой формы с узкими поперечно ориентированными кристами и вакуолями, расположенными в центре либо на периферии органеллы. В колониях ЭСК подобные митохондрии отсутствуют. Обнаружено, что ЭСК могут отличаться по морфологии митохондрий. Так в составе одной колонии ЭСК в одних клетках могут присутствовать митохондрии со светлым матриксом и узкими кристами, в других – с тёмным матриксом и расширенными кристами. В некоторых клетках выявляются оба типа митохондрий. Кроме того, цитоплазма ЭСК имеет много свободного пространства, занятого полирибосомами, в ней очень мало гладкого ЭПР и не выявляются характерные для клеток ВКМ пучки фибрилл. Предполагается, что, несмотря на сходное свойство плюрипотентности, которым обладают клетки ВКМ и ЭСК, выявленные ультраструктурные различия свидетельствуют о более сниженном морфогенетическом потенциале ЭСК в сравнении с клетками ВКМ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-01469.

Новый подход к анализу гидрофобных/гидрофильных свойств на поверхности белков

В.М. Табакмахер^{1*}, А.О. Чугунов², Е.А. Зелепуга¹, Р.Г. Ефремов².

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Еляков, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

* tabval@yandex.ru

Гидрофобные взаимодействия играют ключевую роль в процессах белкового фолдинга, образования и стабилизации биомолекулярных комплексов. Понимание природы этих взаимодействий, их качественная и количественная оценка открывают колоссальные возможности при изучении механизмов функционирования различных биологических систем на молекулярном уровне, предсказании пространственной структуры белок-белковых, -лигандных, -мембранных комплексов и направленном дизайне лекарственных препаратов. В связи с этим на сегодняшний день актуальна проблема анализа гидрофобных свойств биомолекул, играющих роли как рецепторов, так и лигандов. В настоящее время разработан ряд методов и подходов к решению этой задачи. Одним из наиболее динамично развивающихся методов, используемых для изучения гидрофобных свойств соединений различной природы, является метод Молекулярного Гидрофобного Потенциала (МГП) [1].

Метод МГП позволяет количественно оценивать эмпирические «гидрофобные поля» молекулярных систем [1]. В рамках метода принимается, что величина МГП в данной точке пространства M : (i) равна суперпозиции вкладов, создаваемых отдельными частями (атомами или фрагментами) всей молекулярной системы; (ii) монотонно убывает по мере увеличения расстояния r между атомом, создающим потенциал, и точкой M :

$$MLP_M = \sum_i^N f_i \times d |r_i - r_M| \quad (1)$$

где N – количество атомов в системе; f_i – соответствующая атомарная гидрофобная константа (установленная эмпирически для каждого атома в его химическом окружении); d – функция расстояния, описывающая убывание величины МГП; $|r_i - r_M| \equiv r$. Одним из примеров успешной реализации метода МГП является программа PLATINUM [2], созданная специально для анализа гидрофобных/гидрофильных взаимодействий и количественной оценки их вклада в формирование (стабилизацию) биомолекулярных комплексов.

На основе метода МГП нами разработан новый подход, позволяющий проводить тонкий анализ распределения гидрофобных/гидрофильных свойств на молекулярной поверхности белка. Этот подход основан на проекции свойств, распределенных на поверхности молекулы, на простые геометрические формы — плоскость, цилиндр или сферу. При этом данные приводятся к регулярной форме, что позволяет легко обрабатывать их математически, а также визуализировать в виде двумерных карт. Кроме того, наш подход позволяет анализировать гидрофобность молекулярной поверхности не только для статической структуры, но и качественно и количественно учитывать конформационную подвижность молекулы, рассчитываемую в молекулярно-динамическом эксперименте. Разработанный алгоритм реализован в виде специализированного программного обеспечения.

Новый подход был использован нами для изучения распределения гидрофобных свойств на поверхностях ряда пептидных токсинов из ядов пауков. Полученные результаты впервые позволили объяснить различия в специфичности взаимодействия токсинов с их биологическими мишенями.

1. Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., et al. // Curr. Med. Chem. 2007, 14, 393–415.

2. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., et al. // Bioinformatics. 2009, 25, 1201–2.

Работа поддержана грантами ДВО РАН № 12-III-B-05-011, РФФИ № 10-08-003-16-а и № 11-04-01179-а.

Монанхомикалины А и В - необычные гуанидиновые алкалоиды из губки *Monanchora pulchra*

К.М. Табакмахер*, А.С. Кузьмич, Т.Н. Макарьева

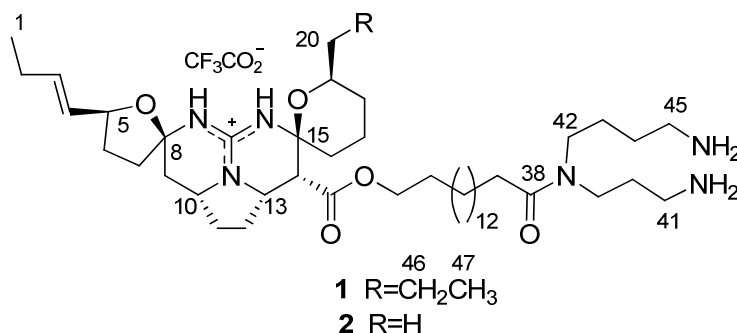
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*dark_xen@mail.ru

Пентациклические гуанидиновые алкалоиды, имеющие одинаковый [5,6,8b]-триазAPERгидроацenaфтaленовый фрагмент, являются хорошо известной группой вторичных метаболитов морского происхождения [1-3]. Уникальные по химическому строению и биологическим свойствам, они представляют большой интерес для развития биоорганической химии.

В ходе изучения природных соединений из морских губок, нами были выделены два новых пентациклических гуанидиновых алкалоида из дальневосточной морской губки *Monanchora pulchra*, названные монанхомикалинами А (**1**) и В (**2**). Их структуры установлены с помощью физико-химических методов, таких как масс-спектрометрия: HRMALDI-TOF-MS и HRESI-MS, ЯМР-спектроскопия, включая двумерные эксперименты: COSY, HMBC, HSQC и TOCSY, а также химической трансформации **1**.

Соединения **1** и **2** показали высокую цитотоксическую активность в отношении клеток лейкемии человека HL-60 с IC₅₀ 120 и 140 нМ соответственно.



1. Berlinck, R. G. S. // Nat. Prod. Rep 2002, 19, P. 617–649.
2. Berlinck, R. G. S.; Kossuga, M. H. // Nat. Prod. Rep 2005, 22, P. 516–550.
3. Berlinck, R. G. S.; Burtoloso, A. C. B.; Trindade-Silva, A. E.; Romminger, S.; Morais, R. P.; Bandeira, K.; Mizuno, C. M. // Nat. Prod. Rep 2010, 27, P. 1871–1907.

Химический состав и содержание полифенолов в клеточной культуре *Iris Pseudacorus* L.

Д.В. Тарбеева*, С.А. Федорев

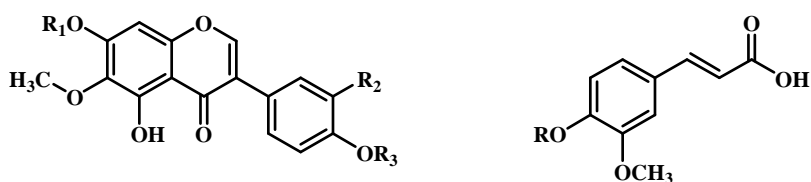
Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б.Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

* tarbeeva1988@gmail.com

Растения рода *Iris* используются в народной медицине с древнейших времён [1]. Известно, что они биосинтезируют различные флавоноиды и изофлавоноиды [1-4]. Среди множества метаболитов растений рода *Iris* особое место занимают изофлавоноиды, которые обладают антиоксидантными, антимикробными, противовоспалительными и эстрогенными свойствами. Поэтому они широко известны как профилактические и лекарственные средства при лечении опухолевых, сердечно-сосудистых заболеваний и остеопороза [1, 5].

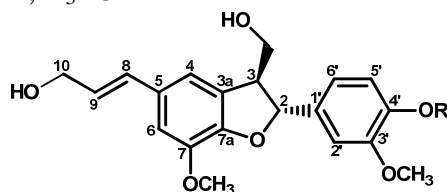
Однако сведения о биосинтезе этих полифенольных метаболитов клеточными культурами этих растений ограничены. Изучение биосинтеза полифенольных соединений в клеточных культурах растений, а также использование различных методов биотехнологии позволяют существенным образом увеличить продукцию этих метаболитов [6, 7].

Объектом данного исследования послужила клеточная культура, полученная из листьев растения *Iris pseudacorus* L. Культура каллусов выращивалась на среде WB/A [7] в накопительном режиме в течение 30 суток. Из спиртовых экстрактов каллусов *I. pseudacorus* методом колоночной хроматографии на сорбентах с обращённой фазой были выделены и структурно идентифицированы 3 известных изофлавоноида: текторигенин - 5,7,4'-тригидрокси-6-метоксиизофлавоон (1), текторидин - 7-O-β-D-глюкопиранозид 5,7,4'-тригидрокси-6-метоксиизофлавоона (2), иристекторигенин А - 5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксиизофлавоон (3), лавандозид - 4-O-β-D-глюкопиранозид 4-гидрокси-3-метоксикоричной кислоты (4) и 4-O-β-D-глюкопиранозид дегидродикониферилового спирта - (E)-3-[(2R,3S)-2,3-дигидро-2-(3'-метокси-4-O-β-D-глюкопиранозилфенил)-3-гидроксиметил-7-метокси-1-бензо[b]фуран-5-ил]-2-пропен-1-ол (5).



1. R₁=H ; R₂=H; R₃=H
2. R₁ = β-D-Glc; R₂ = H; R₃ = H
3. R₁=H; R₂=OH; R₃=CH

4. R = β-D-Glc



5. R = β-D-Glc

Для установления структур выделенных соединений были использованы методы ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии с применением экспериментов COSY, HMBC, HSQC, NOESY, а также хроматомасс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС) и спектроскопия кругового дихроизма (КД). Изофлавоноиды текторигенин (1), текторидин (2) и иристекторигенин А (3) ранее были выделены из нативного растения *I. pseudacorus* [2-4]. Полифенолы 4 и 5 впервые

были идентифицированы нами в клеточной культуре *I. pseudacorus*. Следует отметить, что фенилпропаноид **4** является доминирующим компонентом цветков *Lavandula spica* [8], а неолигнан **5** был впервые выделен из растения *Euphrasia rostkoviana*. Конфигурация асимметрических центров при С-2 и С-3 у лигнана **5** определена сравнением его спектров КД с данными опубликованными в литературе [10].

Качественный состав и количественное соотношение полифенольных метаболитов в культивируемых клетках *I. pseudacorus* проводили методом ВЭЖХ с использованием дегидрохверцетина в качестве внутреннего стандарта. Содержание метаболитов определено в пересчёте на сухую массу культивируемых клеток *I. pseudacorus*. Для всех выделенных веществ данный показатель не превышал 0,3%. В наибольшем количестве (0,28%) клеточные культуры продуцировали текторигенин (**1**). Содержание текторидина (**2**), иристоригенина А (**3**) и лавандозида (**4**) в клеточных культурах составило 0,18; 0,08 и 0,24% соответственно.

Изучено влияние элиситеров и компонентов питательных сред (6-бензоаминопурпурин, 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота, фенилаланин и глицерат меди) на рост и продукцию полифенолов **1 – 5** клеточными культурами *I. pseudacorus*. Увеличение биосинтеза в клеточной культуре *I. pseudacorus* этих полифенолов позволит начать изучение фармакологических свойств этих метаболитов для последующего создания на их основе нового лекарственного средства или биологически активной добавки к пище.

1. Nadaroglu, H.; Demir, Y.; Demir, N. // Pharm. Chem. J. 2007, 41, P. 13-18.
2. Hanawa, F.; Tahara, S.; Mizutani // J. Phytochemistry. 1991, 30, P. 2197-2198.
3. Hanawa, F.; Tahara, S.; Mizutani // J. Phytochemistry. 1991, 30, P. 157-163.
4. Shawl, A.S.; Kumar, T. // Phytochemistry, 1992, 31, P. 1399-1401.
5. Veitch N.C. // Nat. Prod. Rep. 2007, 24, P. 417-464.
6. Fedoreyev, S.A.; Pokushalova, T.V.; Veselova, M.V.; Glebko, L.I.; Muzarok, T.I.; Seletskaya, L.D.; Bulgakov, V.P.; Zhuravlev, Yu.N. // Fitoterapia. 2000, 71, P. 365-372.
7. Bulgakov, V.P.; Veselova, M.V.; Tchernoded, G.K.; Kiselev, K.V.; Fedoreyev, S.A.; Zhuravlev, Yu.N. // Planta. 2005, 221, P. 471-478.
8. Куркин, В.А.; Ламрини, М.; Клочков, С.Г. // Химия природ. соединений. 2008, 2, P. 133-134.
9. Salama, O.; Chaudhuri, R.K.; Sticher, O. // Phytochemistry. 1981, 20, 11, P. 2603-2604.
10. Yuen, M.S.M.; Xue, F., Mak, T.C.W., Wong, H.N.C. // Tetrahedron. 1988, 54, P. 12429-12444.

Исследование роли С-концевой аминокислотной замены на экспрессию и созревание OmpY порина *Yersinia pseudotuberculosis* в клетках *E. coli*.

Н.М. Тищенко*, О.Ю. Портнягина, В.А. Хоменко, М.П. Исаева, Т.Ф.Соловьева
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.
Владивосток, Россия
*fayzulina83@gmail.com

Новый порин OmpY предсказан на основе анализа генома *Yersinia pseudotuberculosis*. Данные филогенетического анализа позволяют предполагать, что OmpY принадлежит к новой группе неспецифических бактериальных поринов. В силу его низкой представленности в клетке, он был получен в виде рекомбинантного белка. Ранее нами было показано [1], что белок по сравнению с другими поринами обладает пониженной термостабильностью, которая, возможно, определяется структурными особенностями С-концевого фрагмента OmpY.

С целью изучения роли С-концевого фрагмента был получен рекомбинантный rOmpYmut, у которого второй остаток с С-конца, положительно заряженный Arg, был замещен на незаряженный Gln. Этот остаток характерен для большинства неспецифических поринов. Для этого ген *ompY* из *Y. pseudotuberculosis* изменили методом сайт-направленного мутагенеза и клонировали в экспрессионный вектор pET32b. Далее была проведена серия экспериментов по оптимизации экспрессии, в результате которой были подобраны условия для получения зрелого белка в преобладающем количестве.

Сравнение спектральных данных, а также данных о соотношении элементов вторичной структуры показало, что рекомбинантные мутантный и нативный OmpY порины имеют подобные, но не идентичные вторичную и третичную структуры.

Установлено, что тримерная структура мутантного порина, также как структура rOmpY, нестабильна в растворах детергентов, о чем свидетельствуют данные по термостабильности олигомера. Тримеры rOmpYmut сохраняются при нагревании в 1% ДСН только до 40°C. Наблюдается понижение температуры перехода «тример - денатурированный мономер» с 50°C (для rOmpY порина) до 45°C (для rOmpYmut). Таким образом, кажущаяся температура перехода для мутантного порина оказалась близка к таковой для рекомбинантного OmpY.

Добавление rOmpYmut порина в водную фазу приводит к ступенчатому увеличению проводимости через БЛМ. Величина наиболее вероятной проводимости канала rOmpYmut равна 180 ± 20 пС в 0,1М NaCl и совпадает с величиной, полученной для канала rOmpY.

Результаты ИФА взаимодействия тримеров рекомбинантных поринов, полноразмерного и мутантного с антисывороткой, показали, что замена остатка аргинина в положении 2 с С-конца белка на остаток глутамина, не оказывает влияния на структуру антигенных детерминант rOmpYmut порина.

Таким образом, проведенное исследование не обнаружило существенных различий в структуре и свойствах рекомбинантных поринов: rOmpY, и мутантного, rOmpYmut, и, следовательно, не выявило существенного влияния замены R338Q в rOmpY на его сборку в НМ *E. coli*. Однако для окончательного решения вопроса о роли 2-го с С-конца а.о. в молекуле порина, как видоспецифического маркера, определяющего взаимодействие порина с молекулярной «машиной» для сборки поринов в НМ, необходимы дополнительные исследования.

1. Solov'eva T.F., Likhatskaya G.N., Khomenko V.A., Stenkova A.M., Kim N.Yu., Portnyagina O.Yu., Novikova O.D., Trifonov E.V., Nurminski E.A., Isaeva M.P. // J. Biomolec. Struct. Dyn. 2011. V. 28. N 4. P. 517-533.

Актинопорины мультигенных Hct-A и Hct-S семейств актинии *Heteractis crispa*

Е.С. Ткачева*, Е.В. Лейченко, М.П. Исаева, М.М. Монастырняя, Э.П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.
Владивосток, Россия
*estkacheva@gmail.com

Актинопорины – это белковые цитолизины с молекулярной массой 20 кДа, продуцируемые актиниями и принадлежащие к группе α -пороформирующих токсинов (α -ПФТ) [1]. Эти белки обладают широким спектром биологической активности [2]. Повышенный интерес к изучению актинопоринов связан с необходимостью более глубокого понимания механизма действия этих мембраноактивных белков. Дальнейшего изучения требует также явление мультигенности актинопоринов, обнаруженное недавно у актинии *Heteractis magnifica* [3].

С помощью методов белковой химии из актинии *Heteractis crispa* (= *Radiantus macrodactylus*) выделен индивидуальный белок, названный Hct-S4, N-концевой фрагмент которого отличался от последовательностей ранее полученных актинопоринов из этой актинии RTX-A и RTX-SII. Его молекулярная масса составила 19414 ± 10 Да. Таким образом, был получен новый представитель семейства актинопоринов *H. crispa*.

Аминокислотные последовательности актинопоринов были выведены на основании нуклеотидных последовательностей, полученных методами молекулярной биологии (с использованием кДНК актинии *H. crispa*). На основании отличий в N-концевых аминокислотных остатках последовательности зрелых актинопоринов были разделены на два семейства: 17 имели N-концевой аланин (Hct-A-семейство), а 25 – серин (Hct-S-семейство). Идентичность аминокислотных последовательностей составила от 88 до 99%. Проведен филогенетический анализ всех известных к настоящему времени актинопоринов, а также представителей семейств, полученных в данной работе. Показано, что на филогенетическом дереве они объединяются в семь кластеров. Актинопорины *H. crispa* группируются в четыре кластера. Обнаружено, что представители семейств актинопоринов Hct-A и Hct-S не формируют собственных, а входят в состав одних и тех же кластеров. Предполагается, что дивергенция актинопоринов семейства Stichodactylidae произошла до разделения видов на *H. crispa* и *H. magnifica*.

1. Parker, M.W.; Feil, S.C. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2005, 88, P. 91–142.
2. Turk, T.J. // Toxicol. - Toxin. Rev. 1991, 10, P. 223-262.
3. Wang, Y.; Yap, L.L.; Chua, K.L.; Khoo, H.E. // Toxicon. 2008, 51, P. 1374– 1382.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-08-00316-а и ДВО РАН № 12-III-B-05-007.

Получение антибактериальных наночастиц серебра с использованием трансгенной культуры табака, экспрессирующей ген силикатеина

Е.В. Толок^{1,2*}, Т.В. Авраменко¹, Д.Г. Каменев¹, Веремейчик Г.Н.¹, Шкрыль¹

¹Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

*lotlorien27@gmail.ru

Получение наночастиц металлов является активно развивающейся отраслью нанотехнологий и направлено на получение частиц различных размеров, формы и химического состава. В последние годы в качестве альтернативы существующим физическим и химическим способам получения наночастиц металлов предложен новые подходы с применением экстрактов или отдельных соединений из растений, получивший название - фитосинтез.

Известно, что белок силикатеин отвечает за способность губок использовать кремний, растворенный в морской воде, для формирования кремниевых спикул (игл). Силикатеины разных видов губок способны к поликонденсации TiO₂ и ZrO₂ и к восстановлению металлов из растворов с образованием наночастиц металлов.

Ранее мы клонировали полноразмерный ген силикатеина *LoSilA1* из морской губки *Latrunculia oparinae*. Для проверки предположения о том, что экспрессия гена силикатеина способна изменять фитосинтетические характеристики культуры, ген *LoSilA1* был перенесен в клеточную культуру табака. В другом варианте кодирующую часть гена силикатеина *LoSilA1* сшивают с геном зеленого флуоресцирующего белка GFP кораллов. Культура табака, трансформированная этой конструкцией, использовалась для доказательства биосинтеза белка силикатеина в трансгенных клетках табака. Методом лазерной конфокальной микроскопии мы установили наличие и локализацию зеленых зон свечения GFP, которые свидетельствуют о наличии белка силикатеина. Далее мы изучили формирование наночастиц серебра под действием экстрактов нетрансформированной (контроль) культуры табака и культуры, трансформированной геном силикатеина *LoSilA1*. Оптическая плотность раствора наночастиц, полученных при использовании экстракта контрольной культуры составила 0.5-0.7, а в процессе фитосинтеза при использовании экстракта культуры с геном силикатеина 1.6-2, т.е. увеличение эффективности образования наночастиц составило более 250%. При этом, до 90% наночастиц контрольной культуры составляли крупные частицы с размерами более 40 нм, тогда как 85% частиц, полученных с помощью трансгенной культуры, имели размеры 20-40 нм.

Известно, что наночастицы серебра обладают выраженным антисептическим действием. Нами было изучено противобактериальное действия наночастиц серебра на примере кишечной палочки *Escherichia coli*. Действие наночастиц серебра сравнивали с действием серебра в форме нитрата серебра. Испытывали концентрации наночастиц серебра от 0,005 до 0,03 мкг/мл и серебра (в форме нитрата серебра) от 0,1 до 10 мкг/мл. Наши данные показывают, что ЕС50 (концентрация, при которой количество КОЕ составляло 50% от контроля) нитрата серебра в отношении кишечной палочки составляет 0.73 мкг на мл среды, а МИС (минимальная ингибиторная концентрация, которая полностью ингибировала появление КОЕ) была равна 1,7 мкг на мл, тогда как ЕС50 наночастиц серебра на два порядка меньше и составляет 0,008 мкг на мл среды, а МИС 0,024 мкг на мл.

Метод управление размерами наночастиц металлов в результате экспрессии рекомбинантного белка, описанный в данной заявке на примере наночастиц серебра, на сегодня является первым примером биоинженерии такого рода.

Особенности динамики населения маньчжурского фазана в осенне-зимний период по данным маршрутных обследований в Уссурийском районе

Фисенко П.

Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

Маньчжурский фазан *Phasianus colchicus pallasii* Rothschild, 1903 обитает на юге материкового Дальнего Востока России и прилежащем северо-восточном Китае. На Дальнем Востоке России фазан обитает в наименее благоприятных условиях, особенно зимой.

Для изучения кратковременных сезонных колебаний численности в осенне-зимний период (октябрь-февраль) с 2008 по 2011 гг. проводились пешие маршрутные учеты птиц в Уссурийском районе Приморского края. Суммарная протяженность маршрутов составила 732,18 км. Плотность населения птиц рассчитывалась с помощью общепринятой методики по комплексному маршрутному учету птиц (Равкин, Челинцев, 1990). Изученный период характеризовался ранним выпадением снега (конец октября – начало ноября), установлением сплошного снежного покрова и низкими температурами.

Максимальна плотность населения фазанов, в природно-антропогенных биотопах, фиксировалась в октябре – ноябре во все годы исследования. Ее значения составили: 2008/09 – 9,96 (особей/км²), 2009/10 – 8,13 (особей/км²), 2010/11 – 8,63 (особей/км²).

Нами зафиксировано резкое сокращение населения фазанов в сельскохозяйственных биотопах после установления сплошного снежного покрова, последующее полное исчезновение фазанов в природных местообитаниях в январе-феврале 2009 и 2011 гг. и массовое посещение ими прилежащих населенных пунктов.

В январе-феврале 2010 г. плотность населения фазанов составляла 3,72-0,56 (особей/км²) что объясняется в первую очередь высоким урожаем плодов яблони маньчжурской (*Malus mandschurica*) и яблони ягодной (*M. baccata*) в 2009 г., которые стали основной пищей птиц зимой. Это подтверждается мозаичностью распределения встреч фазанов, основная их масса встречалась на маршрутах, пролегавших вблизи пойменных редколесий и зарослей, где произрастают и дикие яблони.

Зимнее распределение фазана зависит от доступности пищи. При снежной зиме и наличии доступа к пищевым растениям (плоды диких яблонь, боярышника) фазан может оставаться в местах их произрастания в поймах рек и на склонах сопок. В качестве убежищ используются полости под снегом, образованные травянистой и кустарниковой растительностью.

Широкая связь фазана с антропогенными местообитаниями, включая зону застройки, в течение годового цикла, а особенно в холодное время года, позволяет считать его геми-синантропным видом.

Молекулярное клонирование токсинов Кунитц-типа из актинии *Heteractis crispa* – потенциальных блокаторов потенциал-зависимых калиевых каналов

В.Е. Чаусова*, И.Н. Гладких, Е.В. Лейченко, К.В. Гузев, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская, М.П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*v.chausova@gmail.com

Интерес к изучению структурно-функциональных особенностей полипептидов Кунитц-типа связан с обнаружением у них в ядах некоторых организмов способности модулировать функциональную активность различных типов ионных каналов, в связи с чем, их принято называть токсинами Кунитц-типа. Морские кишечнополостные, в частности актинии, являются уникальным источником не только ингибиторов сериновых протеиназ, но и токсинов Кунитц-типа, блокирующих K_v - и TRPV1-каналы. Такие функциональные свойства могут свидетельствовать о возможном терапевтическом потенциале токсинов Кунитц-типа актиний для лечения заболеваний, вызванных дисфункцией ионных каналов. Токсины Кунитц-типа также могут рассматриваться в качестве потенциальных инструментов исследования молекулярных механизмов функционирования данных каналов.

Для идентификации токсинов Кунитц-типа на транскриптомном и геномном уровнях у актинии *Heteractis crispa* были сконструированы ген-специфичные праймеры на основе известной последовательности токсина SHTX III из актинии *Stichodactyla haddoni*. Также в данной работе был использован генетический материал актинии *Stichodactyla mertensii*.

В результате установлены первичные структуры шести зрелых изоформ токсинов Кунитц-типа *H. crispa* (НСТХ-токсины) и трех зрелых изоформ токсинов Кунитц-типа актинии *S. mertensii* (SMTX-токсины). Обнаруженные изоформы НСТХ- и SMTX-токсинов отличались лишь единичными аминокислотными заменами. Среди НСТХ-токсинов наиболее представленными были две изоформы, а среди SMTX-токсинов – одна. Обнаружено, что НСТХ- и SMTX-токсины имеют высокую гомологию с SHTX III (от 90 до 98%), но крайне низкую – с представителями токсинов Кунитц-типа актиний семейства Actiniidae (от 38 до 54%), дендротоксином К (классический блокатор K_v -каналов, от 34 до 37%) и ВРТИ (классический ингибитор сериновых протеиназ, от 43 до 46%). Первичные структуры данных токсинов характеризуются наличием функционально важных остатков в N-концевом участке, образующих главный сайт связывания с K_v -каналами – Leu7, Arg9 и Leu10. Возможно, что эти токсины подобно SHTX III также будут проявлять и трипсинингибирующую активность, поскольку имеют P_1 остаток Arg в центре реактивного сайта, а окружающие его остатки – у всех представителей консервативны. Сравнительный анализ расчетных физико-химических характеристик НСТХ- и SMTX-токсинов показал, что они являются менее заряженными молекулами в сравнении с токсинами актиний семейства Actiniidae, HCGS- и HCRG-полипептидов *H. crispa*.

Таким образом, впервые идентифицированы первичные структуры 6 высокогомологичных изоформ зрелых НСТХ-токсинов, которые характеризуются меньшим значением заряда молекулы и крайне низкой степенью полиморфизма в сравнении с ранее изученными HCGS- и HCRG-полипептидами актинии *H. crispa*. На основании полученных данных можно предположить, что НСТХ-токсины являются представителями комбинаторной библиотеки полипептидов Кунитц-типа *H. crispa* и должны не только проявлять трипсинингибирующую активность, но и блокировать K_v -каналы.

Взаимодействие неспецифических поринов наружной мембраны *Yersinia ruckeri* с клетками эукариот

Д.К. Чистюлин^{‡*}, А.С. Кузьмич[‡], О.В. Черников, О.Ю. Портнягина

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*cdk27@mail.ru

[‡] авторы внесли равный вклад при подготовке работы

Неспецифические порины, OmpF и OmpC белки наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий, обладают иммуномодулирующей активностью и рассматриваются многими исследователями как факторы патогенеза. Изолированные порины являются высоко иммуногенными и протективными антигенами и могут быть использованы как эффективные компоненты при конструировании вакцинных препаратов. Однако для успешного использования этих белков в качестве вакцин необходимо определить их токсичность. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия OmpF и OmpC поринов *Yersinia ruckeri* с клетками эукариот (клетки лейкоза человека ТНР-1 и половые продукты морского ежа *Strongylocentrotus nudus*). В эксперименте были использованы различные молекулярные формы (тримеры и мономеры) OmpC и OmpF поринов, выделенные по методу Розенбуша экстракцией SDS и очищенные от низкомолекулярных белков с помощью колоночной хроматографии на сефакириле S-200.

Диапазон исследуемых концентраций белков составлял: для OmpF 1080-270 мкг/мл; для OmpC – 450 -113 мкг/мл. Клеточный цикл эукариот состоит из двух периодов: (1) интерфазы, во время которой идет синтез ДНК и белков и (2) митоза, стадии клеточного деления. Интерфаза, в свою очередь, состоит из фазы начального роста (G1), во время которой идет синтез мРНК, белков и других клеточных компонентов, S-фазы (репликации ДНК) и G2 фазы подготовки к митозу. Установлено, что в присутствии обеих молекулярных форм OmpF порина в 1.5 раза увеличивается количество клеток ТНР-1 в фазе S. В присутствии мономеров OmpF практически полностью отсутствуют клетки в фазе G2 (от 19.6% в контроле до 0.24 - 0% в опыте). В случае тримеров этого порина также наблюдается снижение количества клеток в этой фазе, но эффект наиболее выражен при низких концентрациях белка в отличие от мономеров, которые эффективны во всем диапазоне исследуемых концентраций (1080-270 мкг/мл). Тот же самый эффект был характерен и для олигомерной формы другого неспецифического порина *Y. ruckeri*, OmpC порина. Так же, как и в случае OmpF порина, наиболее выражен он был при снижении концентрации белка приблизительно в 4 раза (от 450 до 113 мкг/мл): наблюдалось увеличение в 1.5 раза количества клеток в фазе S и резкое уменьшение количества клеток, находящихся в фазе G2 (до 1.33 % в опыте). В то же время, под действием мономеров OmpC белка существенных изменений в соотношении клеток, находящихся на разных фазах клеточного цикла в интерфазе не наблюдалось. Показано, также что OmpF и OmpC белки по-разному влияют на увеличение количества клеток в состоянии апоптоза. Наиболее активными в этом отношении оказались тримеры Omp F (от 0% в контроле до 18.26% в опыте). Однако следует отметить, что этот эффект наблюдался только при больших концентрациях белка. В случае мономера OmpF увеличение количества таких клеток (даже при концентрации 1080 мкг/мл) было незначительно, всего 1.67%. Таким образом, можно предположить, что неспецифические порины порины НМ *Y. ruckeri* оказывают действие на развитие опухолевых клеток, в частности препятствуют синтезу белков, необходимых для клеточного деления на стадии подготовки к митозу.

В качестве второй тест-системы были использованы половые продукты морского ежа *S. nudus*. Тест на неоплодотворённых яйцеклетках не показал какого-либо влияния исследуемых веществ на их способность к оплодотворению. Выявлено воздействие

исследуемых поринов на оплодотворяющую способность спермы ежа: ингибирующая концентрация OmpC составила 250 мкг/мл, OmpF – 350 мкг/мл. Однако при низких концентрациях (до 30 мкг/мл) исследуемые вещества не оказывали какого-либо влияния на половые продукты морского ежа. Это делает возможным применение поринов *Y. ruckeri* в качестве компонентов вакцинных препаратов при иммунизации рыб.

Биологическая сущность табачной зависимости

З. Шарифова*

Амурская государственная медицинская академия, г. Благовещенск, Россия

*Zemochk@mail.ru

Проблема табакокурения и табачной зависимости весьма многогранна. Она включает в себя различные аспекты: социальные, экономические, юридические, административные, биологические и, конечно же, медицинские.

Цель настоящей работы - провести патофизиологический анализ имеющейся научной информации по табакокурению и табачной зависимости с тем, чтобы попытаться объяснить этиологию и патогенез данной патологии, которая в настоящее время приобрела характер эпидемии, а также ознакомить с этими данными широкие массы населения и особенно молодежь.

Согласно оценке Всемирной организации здравоохранения, приблизительно 1,1 миллиарда человек в мире являются курильщиками. Это составляет около 1/3 всей популяции старше 15 лет. По ее прогнозам, к 2025 г. число курящих людей увеличится до 1,6 миллиарда человек. Курение табака приобрело характер эпидемии, с которой связан катастрофический рост сердечно-сосудистых заболеваний, болезней органов дыхания, онкологической патологии. При этом число заболеваний и функциональных нарушений, с которыми, по мере накопления научных данных выявляется причинная связь табакокурения, продолжает увеличиваться.

Признанная на сегодняшний день никотиновая концепция табачной зависимости, оставляет, однако, открытым вопрос: почему, несмотря на «популярность» табакокурения, 30% мужчин и 70% женщин не курят? Вероятно, решающую роль в возникновении данной патологии играют биологические и личностные особенности человека. Можно предположить, что у некурящих людей не нарушен механизм избегания курения, который препятствует формированию соответствующей зависимости.

Сегодня стало очевидным, что природа табачной зависимости должна рассматриваться с использованием информационного подхода, поскольку она связана не только с повреждением исполнительного клеточного аппарата, но и с нарушением информационного процесса: сигнализации, рецепции, связи и управления клеточными программами, а также с состоянием последних. Возникновение и развитие патологии в данном случае зависит от характера нарушений информационного процесса, возникающих в самом организме. Информационный процесс осуществляется в форме сигналов и представляет собой явления формирования, преобразования, хранения и использования сигналов. В связи с этим важным представляется вопрос о методах, которые могут быть использованы для исследования информационной составляющей действующих на биологический объект раздражителей (компонентов табачного дыма) и визуализации информационной перестройки, происходящей при этом в живом организме. Предпринятый нами в этом направлении обзор научной литературы указывает, что одним из таких методов является метод кристаллографии биологических жидкостей исследуемого организма. Этот метод не требует вмешательства в организм и визуализирует процессы, происходящие на молекулярном уровне. Структура образовавшихся кристаллов жидкости несет интегративную информацию о состоянии биологических объектов, которая может быть использована для диагностики конкретных форм патологии и определения эффективности проводимого лечения.

Действие триэтаноламина и его производных на стабильность мембран

А.М. Шигарова*, В.Н. Нурминский, Г.Б. Боровский

Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Сибирское отделение РАН, г. Иркутск, Россия

**anas_shig@mail.ru*

В настоящее время особую актуальность приобретает поиск экологически безопасных стимуляторов роста растений, обладающих в сверхнизких концентрациях адаптогенными свойствами при неблагоприятных условиях окружающей среды. Из числа биологически активных веществ (БАВ) особый интерес для растениеводства могут представлять некоторые производные триэтаноламина (ТЭА). К ним относятся кремнийорганические соединения – силатраны: 1-метил-, 1-метил-4-хлор- и 1-этоксисилатран (сокращенно МС, ХМС, ЭС, соответственно) Положительное влияние этих соединений в низких дозах на рост и развитие растений показано для широкого ряда культур в полевых экспериментах [1]. Однако физиологические механизмы, с помощью которых эти вещества способны оказывать действие на растения, не были изучены.

Известно, что силатраны являются мембранотропными соединениями, и соответственно, могут влиять на свойства мембран [2]. В наших экспериментах мы можем оценить интегральное действие вещества на стабильность мембраны, но не на ее биологические свойства, однако такие достаточно простые эксперименты могут указывать на стабилизирующие или, напротив, дестабилизирующие его свойства.

Действие исследуемых соединений оценивали по изменению динамики разрушения изолированных вакуолей по сравнению с контролем. Для этого был применен метод цейтраферной компьютерной видеосъемки [3]. Изолированные вакуоли получали по методу [4].

Результаты показывают, что ТЭА и ХМС повышал стабильность мембраны вакуолей по сравнению с контролем (К), причём, в самой низкой из исследованных концентраций - 10^{-13} М. В случае с другими исследованными веществами (МС и ЭС) такого эффекта не наблюдалось (рис. 1).

На основе полученных результатов можно предположить, что ТЭА и ХМС в концентрации 10^{-13} М будут оказывать положительное влияние на рост и развитие растений.

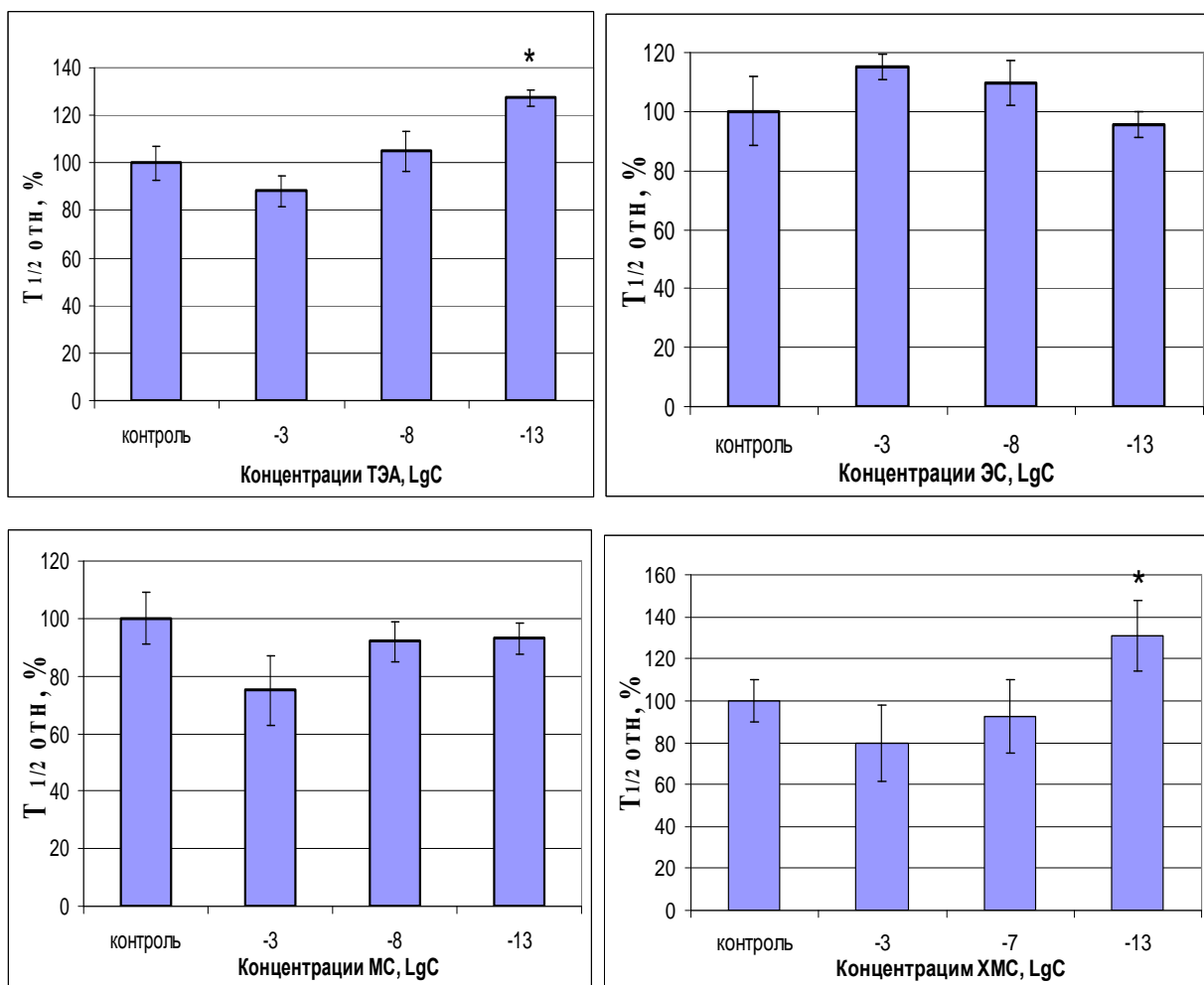


Рис. 1. Влияние триэтаноламина (ТЭА) и ряда силатранов (МС, ХМС, ЭС) на период полураспада изолированных вакуолей. Приведены средние арифметические 3-х биологических повторностей и их стандартные отклонения. * — достоверные отличия периода полураспада вакуолей в сравнении с контролем (без исследуемых веществ) (по t-критерию Стьюдента, $p < 0.05$).

1. Воронков М.Г., Барышок В.П. // Новосибирск: СО РАН. 2005, 257с.
2. Писарский Ю.Б., Казимировская В.Б., Воронков М.Г. // Докл. АН. Т.293, №3, 1987, С. 724-727.
3. Нурминский В.Н., Корзун А.М., Розин С.В., Саляев Р.К. // Биомедицинская химия. 2004, № 50, С. 180-187.
4. Саляев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. // Физиология растений. 1981, Т. 28, № 6, С. 1295-1305.

Влияние экспрессии гена *PgCDPK2ds1* на продукцию резвератрола в клетках винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr.

О.А. Шумакова^{1,2*}, К.В. Киселев¹

¹Биолого-почвенный институт, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия

*shumakova_olga91@mail.ru

Резвератрол является ценным фитоалексином, который обладает рядом положительных свойств для здоровья человека, в том числе предотвращает развитие злокачественных опухолей [1, 2]. Для создания организмов, активно продуцирующих резвератрол, необходимо изучить молекулярные механизмы регуляции биосинтеза этого стильбена. В настоящее время механизмы регулирующие биосинтез стильбенов не известны на достаточном уровне, но установлено, что некоторые сигнальные системы растений, особенно кальциево-сигнальная система, вовлечены в регуляцию биосинтеза стильбенов [3]. У растений основными белками кальциевой сигнальной системы являются кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK) [4].

В данной работе было исследовано влияние вставки регуляторного гена кальциевой сигнальной системы гена кальций-зависимой протеинкиназы *PgCDPK2ds1* из женьшеня *Panax ginseng* Meyer. на биосинтез резвератрола, в культурах клеток винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. Данный ген был выбран, так как известно, что в женьшене *P. ginseng* повышение экспрессии гена *PgCDPK2d* коррелирует с увеличением продукции гингенозидов – биологически активных веществ «корня жизни» [5, 6].

Полученные трансгенные клеточные линии сверхэкспрессирующие *PgCDPK2ds1* имели светлый серо-зеленый цвет, в то время как векторная культура, экспрессирующая только ген устойчивости к канамицину, имела желто-зеленую окраску, характерную для нетрансформированной культуры клеток винограда. В *PgCDPK2ds1*-трансгенных клеточных линиях винограда продукция резвератрола была в 1,2-5,8 раза выше, чем в контрольной культуре клеток винограда. Полученные результаты впервые свидетельствуют о том, что кальций-зависимые протеинкиназы участвуют в регуляции биосинтеза резвератрола в клетках винограда.

1. Athar, M.; Back, J.; Tang, X. // Toxicology and Applied Pharmacology. 2007, 224, P. 274-283.
2. Li, Z; Hong, T; Shimada, Y; Komoto, I; Kawabe, A; Ding, Y; Kaganoi, J.; Hashimoto, Y. // Carcinogenesis. 2002, 23, P. 1531–1536.
3. Vandelle, E; Poinssot, B; Wendehenne, D. // Molecular plant-microbe interactions. 2006, 19, P. 429-440.
4. Ramani, S.; Chelliah, J. // BMC plant biology. 2007, 7, DOI: 10.1186/1471-2229-7-61.
5. Киселев, К.В.; Горпенченко, Т.Ю.; Чернолед, Г.К.; Дубровина, А.С.; Грищенко, О.В.; Булгаков, В.П.; Журавлев, Ю.Н. // Молекулярная биология. 2008, 42, P. 275-285.
6. Kiselev, K.V.; Turlenko, A.V.; Zhuravlev, Y.N. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2009, 99, P. 141-149.

Новые оксирапентины В-Г из морского гриба *Isaria felina* КММ 4639

А.Н. Юрченко*, О.Ф. Сметанина, Ш.Ш. Афиятуллов, А.И. Калиновский, Н.Н. Киричук, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г. Владивосток, Россия
*yurchant@ya.ru

Факультативные и облигатные морские грибы – перспективный источник структурно разнообразных биоактивных соединений [1]. В рамках программы по поиску новых и биологически активных грибных метаболитов мы исследовали гриб *Isaria felina* КММ 4639, выделенный из донных осадков Охотского моря.

Из этилацетатного экстракта гриба были получены шесть новых высокоокисленных хроменов оксирапентинов В-Г (**1-6**), известного оксирапентина А (**7**) [2], нового бензофурана (**8**) и двух известных циклодепептидов изо-исариина В (**9**) и исаридина Е (**10**) [3]. Комбинацией NOESY данных, рентгеноструктурного анализа и модифицированного метода Мошера была установлена абсолютная структура оксирапентина В (**1**). Абсолютные структуры остальных оксирапентинов были определены на основании биосинтетического сходства с **1** и подтверждены анализом значений констант СН взаимодействий. Структура бензофурана (**8**) установлена на основании данных одно- и двумерных спектров ЯМР.

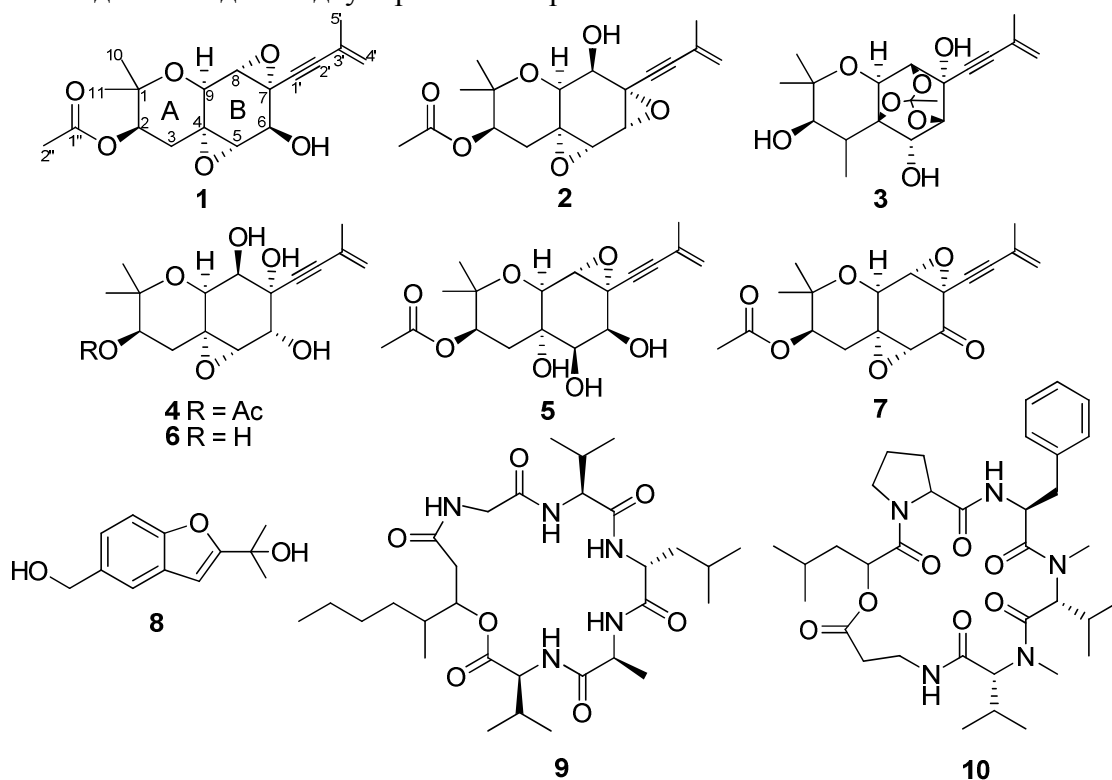


Рис. 1. Структуры выделенных соединений **1-10**

Оксирапентины А (**7**) и D (**3**) проявили слабую антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Оксирапентин А показал цитотоксичность к клеткам линий Т-47D, SK-Mel-5 и SK-Mel-28. Оксирапентины А (**7**), D-F (**3-5**) индуцировали 100% ингибирование формирования колоний клеток SK-MEL-28.

1. Rateb, M.E.; Ebel R. // Nat. Prod. Rep. 2011, 28, P. 290-344.
2. Takahashi, S.; Iron, I.; Takeuchi, M. et al. // J. Antibiot. 1983, 36, P. 1418-1420.
3. Langenfeld, A; Blond, A; Gueye, S. et al. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 825-830

Шаперон-индуцирующая активность ацетилированных трис-О-гликозидов эхинохрома

Е.А. Юрченко*, Е.С. Менчинская, И.Г. Агафонова, С.Г. Полоник, Д.Л. Аминин
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Дальневосточное отделение РАН, г.
Владивосток, Россия
*dminae@mail.ru

В настоящее время разработка противоопухолевых средств на базе шаперонов является одной из приоритетных задач многих исследовательских центров. Показано, что Hsp70 может выходить на поверхность раковой клетки и представлять ее пептиды и опухолевые антигены антиген-презентирующим клеткам, запуская таким образом активацию обеих ветвей иммунной системы, клеточную и гуморальную. В связи с этим, поиск индукторов экспрессии шаперонов (Hsp70 в частности) является актуальным. В работе изучено влияние структуры ацетилированных трис-О-гликозидов эхинохрома **2-4** и их тиоаналогов **5, 6** (Рис. 1) на способность модулировать экспрессию белка теплового шока HSPA1A (Hsp70) в клетках двух типов: перевиваемой асцитной карциноме Эрлиха (АКЭ) методом иммуноблоттинга и линии клеток HeLa-luc (люциферазный метод). Ранее было продемонстрировано, что соединение **2** в микромолярных концентрациях индуцирует усиление экспрессии шаперона в клетках эритролейкемии человека K562 [1]. Нами установлено, что глюкозид **2** обладает дозо-зависимой способностью стимулировать синтез Hsp70 в клетках АКЭ и HeLa-luc. Из изученных аналогов соединения **2** повышение экспрессии вызывало только О-галактозидное производное **3**. Замена аномерного атома кислорода в углеводном радикале **2** на серу (тиогликозиды **5, 6**) приводила к полной потере активности. Среди трис-О-гликозидов эхинохрома с различными сахарами активность показали только производные D-глюкозы **2** и D-галактозы **3**, а трис-О-D-маннозид эхинохрома **4**, как и сам эхинохром **1**, были полностью неактивны.

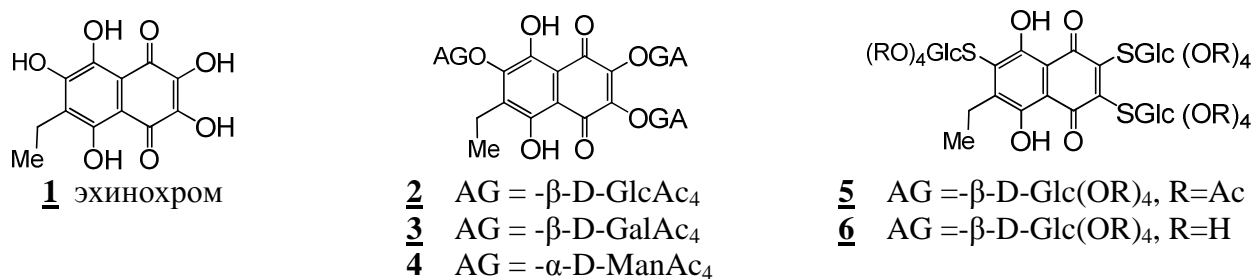


Рис. 1. Структуры изученных соединений

При подкожном введении мышам с асцитной карциномой Эрлиха соединения **2** (100 мг/кг, 6 инъекций через 2 дня) отмечено увеличение средней продолжительности жизни мышей на 25,6%. В МРТ-исследовании динамики развития солидной формы карциномы Эрлиха при подкожном введении соединения **2** происходило выраженное торможение опухолевого роста, составляющее 41% на 21 день после инокуляции.

Таким образом, при введении эффективного *in vitro* шаперон-индуцирующего производного эхинохрома **2** мышам с асцитной и солидной формами опухоли наблюдался достоверный противоопухолевый эффект *in vivo*.

1. Еременко, Е.М. и др. // Цитология. 2010, 52, С. 235-241.

М.В. Астахов Новый прибор для сбора гидробионтов	3
А.И. Ахмерова, Н.П. Мищенко Исследование состава хиноидных пигментов морских ежей с использованием высоко-эффективной жидкостной хроматографии LCMS	4
А.А. Белик, С.Н. Ковальчук Установление структуры полноразмерной κДНК эндо-1,3-β-D-глюканазы из морского моллюска <i>Lambis sp.</i>	5
Е.П. Быстрицкая, А.М. Стенкова, А.Н. Пирко, М.П. Исаева Исследование влияния температуры на экспрессию генов неспецифических поринов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	6
Е.А. Васильева, А.П. Шолох, Н.П. Мищенко Антрахиноидные пигменты корней растения <i>Rubia jesoensis</i>	7
О.С. Вишук, С.П. Ермакова, Т.Н. Звягинцева Противоопухолевая активность и молекулярный механизм действия фукоидана из бурой водоросли <i>Fucus evanescens</i>	8
А. В. Володько, В. Н. Давыдова, И. М. Ермак Реологические свойства геля хитозан-каррагинан	9
Н.О. Вороной, Н.И. Заславская, М.Ю. Баркина Популяционно-генетическая структура эстуарных корбикул Приморья (<i>Bivalvia</i>, Cyrenidae) определяется наличием обмена генов между популяциями	10
Н.А. Гельфанд, И.В. Свистунова, В.И. Разов, Н.П. Шапкин Физико-химическое исследование ацетилацетонатов дифторида бора	11
Н.В. Гончаров, И.С. Гулян, Д.В. Невожай, М.П. Исаева Создание химерного гена <i>ompF::turboGFP</i> для и экспрессии в раковых клетках человека	12
С.А. Дышловой, И. Неац, З. Фенц, С.Н. Фёдоров, Л.К. Шубина, В.А. Стоник, Ш. Балабанов, Ф. Хонекер Исследование молекулярных механизмов действия ааптамина, деметилоксиааптамина и изоааптамина на цисплатин-резистентных опухолевых клетках	13
С.А. Дышловой, А.Г. Гузий, Т.Н. Макарьева, В.А. Стоник, Ф. Хонекер Изучение механизмов противоопухолевого действия морского алкалоида монанхоцидина на лекарственно-устойчивых клетках эмбриокарциномы человека	14
О.С. Ефремова Получение трансгенных растений сои (<i>Glycine max (L.) Merr.</i>) методом агробактериальной трансформации	15
М.В. Жукова, М.Н. Львова, А.В. Катохин, В.А. Мордвинов, Е.В. Киселева Ультраструктурные особенности сперматогенеза марины <i>Opisthorchis felineus</i>	16
Зорикова С.П., Колдаев В.М. Определение суммы флавоноидов в шлемнике байкальском спектрофотометрическим методом при воспалении толстой кишки у мышей	17
Р.С. Калина, А.Н. Кветкина, И.Н. Гладких, В.М. Табакмахер, О.Н. Кривошапко, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская Поиск новых токсинов ASIC3-каналов из актинии <i>Heteractis crispata</i>	18
А. А. Калитник, П. А. Марков, А. В. Володько Защитное действие хитозана и его низкомолекулярного производного	19
Ю.А. Каретин Численный анализ форм прикрепленных <i>in vitro</i> гемоцитов морских беспозвоночных	20
Е.А. Ким Противовоспалительное и антиагрегационное свойства конъюгата бетациклодекстрина с ацетилсалициловой кислотой	21
А.Г. Клыкков, Т.В. Танашкина, А.В. Гажа <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench – перспективный источник флавоноидов	22
А.В. Коротких Гидрохирургический метод в оптимизации лечения гнойных ран мягких тканей	23
А.О. Кравченко, О.С. Белоус Комплексное исследование водоросли <i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i> (Rhodophyta, Phyllophoraceae)	24
А.Ю. Кравченко <i>Pungitius polyakovi</i> Shedko - младший синоним <i>Pungitius tymensis</i> Nikolsky <i>Fraudatrix</i>	25
А.А. Ларионова, В.В. Панькова, И.Ю. Долматов Экспрессия гена <i>Sox17a</i> при регенерации у голотурии <i>Eupentacta</i>	26
А. П. Литовченко, И.О. Чащин, И.В. Чикаловец Определение активности лектинов мидии <i>Crenomytilus grayanus</i> в ответ на заражение дрожжами <i>Pichia pastoris</i>	27
А.В. Любицкая Оценка образцов риса коллекции ВНИИР по хозяйственно-биологическим признакам	29
И.Н. Ляпун, Н.Г. Плехова, Г.Г. Компанец, Л.М. Сомова Изменение метаболизма нейтрофилов, зараженных хантавирусом	30
М.А. Майорова, Н.А. Одинцова Пролиферативный потенциал клеток личинок мидии <i>Mytilus trossilus</i> в культуре и локализация αVβ3-подобного интегрина в клетках в процессе нейрональной и мышечной дифференцировки	31
Д.А. Малькеева, М.В. Жукова, Е.В. Киселева Токсин бактерий <i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i> способствует горизонтальному переносу симбиотических бактерий <i>Wolbachia</i>	33

между линиями <i>Drosophila melanogaster</i>		
И.В. Манжуло, И.В. Дюйзен Аналгетическое действие докозагексаеновой кислоты при формировании нейропатического болевого синдрома у крыс		34
А.Ю. Маняхин, Л.И.Моисеенко Ультразвуковая экстракция флавоноидов <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi		35
Е.А. Мартыяс, Н.И. Герасименко, Н.Г. Бусарова, С.В. Логвинов, М.М. Анисимов Биологическая активность и жирнокислотный состав глицерогликолипидов морских водорослей дальневосточных морей		36
Н.В. Мацшина Фенология колорадского жука <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) в Приморском крае		38
Е.С. Менчинская, Т.Ю. Горпенченко, Д.Л. Аминин Исследование влияния кукумариозида A₂-2 на мультилекарственную устойчивость опухолевых клеток		39
Р.В. Меньшова, С.П. Ермакова, В.Н. Ум, Т.Н. Звягинцева Состав и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли <i>Eisenia bicyclis</i> (Ю. Корея)		40
П.В. Мищенко, Н.Е. Зюмченко Влияние различных белковых и углеводных субстратов на дифференцировку, адгезию и пролиферацию нейральных стволовых клеток головного мозга эмбрионов крыс в культуре		41
О.С. Огурцова, И.В. Дюйзен Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты в модели спинальной травмы у крыс		43
Д.Н. Пелагеев, С.А. Дышловой, К.Л. Борисова, С.В. Драган, Н.Д. Похилло Нафтохинон-углеводные конъюгаты негликозидной природы - новый тип водорастворимых производных нафтохинона. Синтез и биологическая активность		44
С.А. Пинкус Получение растений риса из клеточных культур, трансформированных геном пирролин-5-карбоксилат синтазы		45
Е.А. Пислягин, П.С. Дмитренко, Д.Л. Аминин Определение фармакокинетических свойств кукумариозида A₂-2 методом МАЛДИ масс-спектрометрии и молекулярной визуализации		46
Р.С. Попов, Н.В. Иванчина, П.С. Дмитренко Масс-спектрометрическое изучение стероидных гликозидов из дальневосточной морской звезды <i>Aphelasterias japonica</i>		47
Ю.Е. Сабудкий, Н.С. Полоник Синтез водорастворимых 6,7-диглутатионильных производных 2-гидрокси-3-алкилнафтазарин		48
С.А. Самогылова, А.М. Заболотная, В.А. Реутов Исследование некоторых факторов влияющих на извлечение окрашивающих веществ из шелухи гречихи		49
С.А. Сарин, Ю.А. Щипунов Структурные исследования нанокомпозитных пленок на основе хитозана и неорганических наночастиц глины		50
О.В. Сидорова, Д.К. Чистюлин Выделение, рефолдинг и иммунохимические свойства мутантных OmpF поринов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> с делециями наружных петель		51
В.Е. Силантьев, И.В. Постнова, Ю.А. Щипунов Формирование, структура и свойства нанокомпозитов хитозана с наночастицами глин, полученных методом регулируемого заряжения полисахарида		52
О.В. Синцова, И.Н. Гладких, Е.В. Лейченко, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская Выделение и изучение ингибиторов протеиназ из актинии <i>Heteractis magnifica</i>		53
А.А. Сколубович, З. Шарифова Исследование эффективности использования в комплексной терапии левокарнитина и виферона у детей, которые болеют острой пневмонией		54
М. П. Соболевская, Ш. Ш. Афиятулло, С. А. Дышловой, Н. Н. Киричук, В. А. Денисенко, Н. Ю. Ким, А. А. Бочарова Метаболиты из морского изолята гриба <i>Aspergillus versicolor</i> КММ 4644		55
Л.А. Сульдина, Е.Ю. Короткевич Реорганизации клеток внутренней массы бластоцисты мыши в процессе их развития в условиях <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>		56
В.М. Табакмахер, А.О. Чугунов, Е.А. Зелепуга, Р.Г. Ефремов Новый подход к анализу гидрофобных/гидрофильных свойств на поверхности белков		57
К.М. Табакмахер, А.С. Кузьмич, Т.Н. Макарьева Монанхомикалины А и В - необычные гуанидиновые алкалоиды из губки <i>Monanchora pulchra</i>		58
Д.В. Тарбеева, С.А. Федореев Химический состав и содержание полифенолов в клеточной культуре <i>Iris Pseudacorus</i> L.		59
Н.М. Тищенко, О.Ю. Портнягина, В.А. Хоменко, М.П. Исаева, Т.Ф.Соловьева Исследование роли С-концевой аминокислотной замены на экспрессию и созревание OmpY порина <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в клетках <i>E. coli</i>.		61
Е.С. Ткачева, Е.В. Лейченко, М.П. Исаева, М.М. Монастырская, Э.П. Козловская Ктинопорины мультигенных Hct-A и Hct-S семейств актинии <i>Heteractis crispa</i>		62
Е.В. Толок, Т.В. Авраменко, Д.Г. Каменев, Веремейчик Г.Н. Шкрыль Получение антибактериальных наночастиц серебра с использованием трансгенной культуры табака, экспрессирующей ген силикатина		63
Фисенко П. Особенности динамики населения маньчжурского фазана в осенне-зимний		64

период по данным маршрутных обследований в Уссурийском районе	
В.Е. Чаусова, И.Н. Гладких, Е.В. Лейченко, К.В. Гузев, М.М. Монастырная, Э.П. Козловская, М.П. Исаева Молекулярное клонирование токсинов Кунитц-типа из актинии <i>Heteractis crispa</i> – потенциальных блокаторов потенциал-зависимых калиевых каналов	65
Д.К. Чистюлин, А.С. Кузьмич, О.В. Черников, О.Ю. Портнягина Взаимодействие неспецифических поринов наружной мембраны <i>Yersinia ruckeri</i> с клетками эукариот	66
З. Шарифова Биологическая сущность табачной зависимости	68
А.М. Шигарова, В.Н. Нурминский, Г.Б. Боровский Действие триэтанолamina и его производных на стабильность мембран	69
О.А. Шумакова, К.В. Киселев Влияние экспрессии гена <i>PgCDPK2ds1</i> на продукцию резвератрола в клетках винограда амурского <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	71
А.Н. Юрченко, О.Ф. Сметанина, Ш.Ш. Афиятуллов, А.И. Калиновский, Н.Н. Киричук, С.П. Ермакова Новые оксирапентины В-Г из морского гриба <i>Isaria felina</i> КММ 4639	72
Е.А. Юрченко, Е.С. Менчинская, И.Г. Агафонова, С.Г. Полоник, Д.Л. Аминин Шаперон-индуцирующая активность ацетилированных трис-О-гликозидов эхинохрома	73