Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН)

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ, ПОСВЯЩЕННАЯ 55-ЛЕТИЮ ТИБОХ ДВО РАН И 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЕГО ОСНОВАТЕЛЯ АКАДЕМИКА Г.Б. ЕЛЯКОВА

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

11-15 сентября 2019 г. Владивосток

Научная конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова: Материалы конференции / Владивосток, 11 – 15 сентября 2019. – Владивосток

ISBN 978-5-91849-148-5

Сборник включает участников конференции, тезисы докладов организованной Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Тихоокеанским институтом биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Представленные работы посвящены решению фундаментальных проблем связанных с созданием новых лекарств и других биопрепаратов; сбором и описанием новых биологических источников биоактивных веществ, включая бактерии и микроскопические грибы; разработкой новых синтезов изучением биологических высокоактивных веществ; функций физиологического действия природных соединений; изучением структурного и функционального разнообразия биомолекул. Материалы представляют интерес как для специалистов, работающих в области химии и биохимии природных соединений, так и междисциплинарных наук, молекулярной генетики, клеточной биологии, физиологии и медицины.

> УДК 577 ББК 28.07

Организационный комитет выражает благодарность за оказанную поддержку: Федеральному государственному бюджетному учреждению науки Тихоокеанскому институту биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-20071\19) Спонсоров: Шимадзу Европа ГмбХ, ООО «ДжиИ Хэлскеа», ООО ПТФ «Корпус»

ISBN 978-5-91849-148-5

Организатор

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



Научная конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова организована при финансовой поддержке

Российский фонд фундаментальных исследований



Шимадзу Европа Γ мбX



ООО «ДжиИ Хэлскеа»





Председатель Оргкомитета

Стоник Валентин Аронович, академик РАН, научный руководитель Института

Организационный комитет

Дмитренок Павел Сергеевич, к.х.н., врио Директора Института Михайлова Валерий Викторович, член-корр. РАН, зав. Лабораторией микробилогии Макарьева Татьяна Николаевна, д.х.н., г.н.с.

Куриленко Валерия Валерьевна, к.б.н., ученый секретарь Института Кусайкин Михаил Игоревич, к.б.н., зам. директора по научной работе Черников Олег Викторович, к.б.н., зам. директора по научной работе Шепетова Наталья Михайловна, помощник директора по международным связям Кокоулин Максим Сергеевич, к.х.н., с.н.с.

Чингизова Екатерина Александровна, к.б.н., н.с.

Программный комитет

Стоник В.А., академик РАН, научный руководитель Института – Председатель, Горовой П.Г., академик РАН, заведующий лабораторией хемотаксономии, Федореев С.А., д.х.н., заведующий лабораторией химии природных хиноидных соединений,

Козловская Э.П., д.х.н., заведующий лабораторией химии пептидов, Давыдова В.Н., к.х.н., заведующий лабораторией молекулярных основ антибактериального иммунитета,

Исаева М.П., к.м.н., заведующий лабораторией морской биохимии, Иванчина Н.В., к.х.н., заведующий лабораторией химии морских природных соелинений.

Дубровская Ю.В., к.б.н., заведующий ОНТИ.

Содержание

Пленарные доклады	6			
Устные доклады	16			
Секция 1. Органический синтез природных соединений	16			
Секция 2. Структура и свойства низкомолекулярных природных соединений	22			
Секция 3. Биополимерные природные соединения	33			
Секция 4. Биологические источники природных соединений	55			
Стендовые доклады	68			
Секция 1. Органический синтез природных соединений	68			
Секция 2. Структура и свойства низкомолекулярных природных соединений	74			
Секция 3. Биополимерные природные соединения	85			
Секция 4. Биологические источники природных соединений				
Заочные участники	107			
Дополнение	110			
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	120			

Пленарные доклады

Применение физико-химических методов анализа в исследованиях структур природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

П.С. Дмитренок

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: paveldmt@piboc.dvo.ru

Одним из важнейших научных направлений, развиваемых в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, является поиск, выделение и установление структур большого числа биоактивных первичных и вторичных метаболитов из различных макро- и микроорганизмов, собранных в разных районах Мирового океана, а также наземных растений Дальнего Востока России. Без знания точных химических структур исследуемых веществ невозможно изучение их биологических активностей, структурно-функциональных взаимосвязей И установление механизмов биологически активных соединений, обладающих биомедицинским потенциалом, конкретных мишеней реализации их физиологической активности, vстановление разработка перспективных лекарственных средств на их основе.

Для определения структур природных соединений применяются различные аналитические методы и стратегии, в первую очередь, современные физико-химические методы, такие как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (1D и 2D ЯМР-спектроскопия) и различные виды масс-спектрометрии, включая масс-спектрометрию высокого разрешения и тандемную масс-спектрометрию. Эти методы неустанно развиваются с увеличением их чувствительности, селективности и разрешающей способности. Развитие МС методов определяется новыми методами разделения (МС ионной подвижности), секвенирования (МС/МС и МС_п), ионизации и профилирования изучаемых метаболитов.

В докладе будет обсуждено применение ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии в установлении структур различных классов природных соединений, выделенных в ТИБОХ ДВО РАН, от полисахаридов, белков и пептидов до низкомолекулярных биорегуляторов, включая алкалоиды, липиды, гликозиды и др. структурные группы веществ. Накопленные знания о структурах полярных стероидов морских звезд и тритерпеновых гликозидов голотурий и механизмах их фрагментации позволили проводить изучения метаболомных профилей целевых групп соединений, что важно для понимания их структурного разнообразия, биологической роли и путей биосинтеза и оценки ресурсного потенциала.

Полисахариды морских гидробионтов для доставки лекарственных средств

<u>И.М. Ермак,</u> В.Н. Давыдова, В.И. Горбач, А.О. Кравченко, В.П. Глазунов, Е.В. Соколова, А.В. Володько

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: imyer@mail.ru

Создание различных систем доставки медицинских препаратов, способных обеспечить длительное действие лекарственного средства и одновременно снизить его суточную дозу, способствует не только продлению времени жизни известных лекарств, но и появлению препаратов с улучшенными фармакологическими и фармакокинетическими свойствами, что позволяет расширить границы их использования. Трансмукозные системы доставки лекарственных средств через слизистую оболочку не требуют особой стерильности и могут применяться в виде спреев, таблеток, гелей, через пероральный, буккальный и местные пути введения. Перспективными кандидатами для создания мукоадгезивных лекарственных форм являются нетоксичные и биосовместимые полисахариды морских гидробионтов: сульфатированные галактаны – каррагинаны (Карр.), выделенные нами из красных водорослей дальневосточных морей, и хитозаны (ХТ). В докладе приведены данные, полученные за период выполнения гранта РНФ, об использовании различных типов каррагинанов и хитозана в качестве матриц для доставки лекарственного средства эхинохром (ЭХ). Сочетание гелеобразующих и мукоадгезивных свойств каррагинанов с широким спектром их физиологической активности, а также способность образовывать комплексы с поликатионами, обеспечило применение этих полисахаридов в качестве основного компонента для получения широкого набора средств доставки в виде наночастиц, гелей, липосом, пленок. Включение ЭХ в полисахаридную матрицу способствует его растворимости и предотвращает от деструкции, о чем свидетельствуют данные, полученные методом спектроскопии, сканирующей микроскопии, электрокинетических измерений и динамического светорассеяния. ЭХ с высокой эффективностью включается в липосомы и гелевые макросферы, полученные на основе полисахаридов, и сохраняет стабильность в этих матрицах после их лиофилизации, согласно спектроскопическим данным. Защитный эффект Карр. и скорость высвобождения ЭХ из полисахаридной матрицы определяются структурными особенностями полимера. Липосомы обладают мукоадгезивными свойствами, что показано в экспериментах *invitro* и exvivo на модели слизистой оболочки ткани кишечника. Мукоадгезивные свойства мультислойных Карр/ХТ плёнок, содержащих ЭХ, зависят от состава входящих в них полисахаридов. Изучена динамика высвобождения ЭХ из макросфер на моделях среды ЖКТ, слезной жидкости и показано, что макросферы, покрытые хитозаном, замедляют высвобождение ЭХ. Оценена модификация физиологической активности ЭХ при включении его в полисахаридную матрицу по способности проникать через эпителиальный слой, воздействовать на иммунную систему организма, защищать слизистые поверхностей от экзогенных раздражителей и инфекционных факторов. В экспериментах invitro и invivo что включение ЭХ в полисахаридную матрицу не влияет на показано, кардиотонический и брадикардический эффекты, но резко усиливает его антиульцерогенное действие, превосходящее эффект фосфолюгеля более чем в 2 раза. Значительное усиление противоязвенного эффекта ЭХ в его комплексе с каррагинаном и купирование раздражения слизистой желудка имеют особо важное значение при пероральном применении этой формы лекарственного средства. В экспериментах *invivo* ЭХ, включённый в Карр. матрицу, ингибирует воспалительный эффект, вызванный бактериальным эндотоксином.

Таким образом, полисахаридные матрицы на основе Карр. обеспечивают дополнительные преимущества для наиболее удобного неинвазивного применения лекарственной субстанции ЭХ и расширяют возможности его использования.

Применение SPR биосенсоров в белковой интерактомике

А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва Электронная почта: alexei.ivanov@ibmc.msk.ru

Оптический биосенсор, работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance, SPR), позволяет осуществлять прямую регистрацию взаимодействий реальном времени без межмолекулярных В использования каких-либо меток или сопряженных процессов. В настоящее время SPRбиосенсоры широко применяются в белковой интерактомике, так как они позволяют исчерпывающие данные об аффинности, специфичности, термодинамике парных белок-белковых взаимодействий (ББВ). Показана также высокая ИХ применения в сочетании с хроматографическими и эффективность спектрометрическими методами для обнаружения неизвестных ранее ББВ с помощью технологии молекулярного фишинга. В наших исследованиях используем оригинальный вариант прямого молекулярного фишинга, основанный на комбинации технологий аффинной и гель-хроматографии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и масс-спектрометрической идентификации белков [1-8]. Использование SPR-биосенсора в данном подходе позволяет оптимизировать:

- (1) протокол получения целевого аффинного сорбента путем использования SPR-биосенсора для подбора оптимальных условий (состав и рН иммобилизационного буфера, концентрация белка, время и скорость потока);
- (2) проконтролировать способность иммобилизованного белка-наживки участвовать в ББВ путем измерений взаимодействия известных белков-партнеров с иммобилизованным на оптическом чипе белком-наживкой;
- (3) протокол получения лизата биоматериала путем анализа возрастания сигнала SPR-биосенсора при инжекции лизата через канал с иммобилизованным белком-наживкой;
- (4) протокол прямого молекулярного фишинга путем его моделирования на оптическом чипе с иммобилизованным белком-наживкой и подбора оптимальной концентрации лизата, состава рабочего буфера, времени и скорости потока, состава элюирующего буфера и времени элюции;
- (5) выполнение SPR валидации обнаруженных потенциальных белков-партнеров путем анализа парных ББВ с использованием чистых препаратов белков.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-54-00015.

- 1. ErshovP., MezentsevY., GnedenkoO., MukhaD., YantsevichA., BritikovV., KaluzhskiyL., YablokovE., MolnarA., IvanovA., LisitsaA., GilepA., UsanovS., ArchakovA. // Proteomics. 2012. V. 12. P. 3295–3298.
- 2. Иванов А.С., Ершов П.В., Мезенцев Ю.А., Поверенная Е.В., Лисица А.В., Арчаков А.И. // Биомед. химия. 2013. Т. 596 № 2. С. 171–182.
- 3. IvanovA.S., MedvedevA., ErshovP., MolnarA., MezentsevY., YablokovE., KaluzhskyL., GnedenkoO., BuneevaO., HaidukevichI., SergeevG., LushchykA., YantsevichA., MedvedevaM., KozinS., PopovI., NovikovaS., ZgodaV., GilepA., UsanovS., LisitsaA., ArchakovA. // Proteomics. 201. V. 14. P. 2261–2274.
 - 4. Иванов А.С., Медведев А.Е. // Биомед. Химия. 2015. V. 61. N. 2. P. 231–238.
- 5. Иванов А.С., Ершов П.В., Мольнар А.А., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Яблоков Е.О., Флоринская А.В., Гнеденко О.В., Медведев А.Е., Козин С.А., Митькевич В.А., Макаров А.А., Гилеп А.А., Лущик А.Я., Гайдукевич И.В., Усанов С.А. // Биоорганич. химия. 2016. Т. 42. № 1.С. 18–27.
- 6. Florinskaya A., Ershov P., Mezentsev Y., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Medvedev A., Ivanov A. // Sensors (Basel, Switzerland). 2018. V. 18. N 5. P. 1616.
- 7. Ершов П.В., Мезенцев Ю.В., Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Гнеденко О.В., Згода В.Г., Вахрушев И.В., Раева О.С., Ярыгин К.Н., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. // Биоорганич. химия. 2019. Т. 45. № 2. С. 155–165.
- 8. Ershov P., Mezentsev Y., Kopylov A., Yablokov E., Svirid A., Luschik A., Kaluzhskiy L., Gilep A., Usanov S., Medvedev A., Ivanov A.// Biology (MDPI). 2019. V. 8. N 2. P. 49[1–18].

Поиск и структурное изучение новых биоактивных вторичных метаболитов из морских беспозвоночных

Т.Н. Макарьева, А.Г. Гузий, Л.К. Шубина, К.М. Табакмахер, Е.К. Кудряшова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: makarieva@piboc.dvo.ru

Беспозвоночные - это многоклеточные, относительно примитивные организмы в основном древнего происхождения, которые особенно разнообразны в морской среде. беспозвоночных, в том числе Porifera (губки), типа (кишечнополостные), Polychaeta (многощетинковые черви), Mollusca, Hemichordata и другие. Причем число исключительно морских типов и классов беспозвоночных в два раза больше, чем наземных. Эти, преимущественно бентосные, животные тропических, умеренных и бореальных вод играют важную роль в соответствующих морских экосистемах. Древнее происхождение, особые условия обитания и экстремальное таксономическое разнообразие во многом определяют то, что морские беспозвоночные являются наиболее богатым и перспективным источником вторичных метаболитов с необычными химическими структурами и часто беспрецедентными биологическими активностями. Поэтому морские беспозвоночные обладают огромным биомедицинским наличия противоопухолевых, них противовоспалительных, противогрибковых, противомикробных и других биоактивных вторичных метаболитов. Наши исследования в течение 40 лет были сосредоточены на поиске, выделении и определении структуры новых биоактивных вторичных метаболитов из разных типов морских беспозвоночных, за исключением традиционного для исследований нашего Института типа Echinodermata, который изучают наши коллеги. Сбор и поиск биологических источников был осуществлен во время научных рейсов на НИС «Профессор Богоров» и «Академик Опарин» в тропические зоны Индийского океана и в северные и тропические зоны Тихого океана. Новые биоактивные вторичные метаболиты, найденные нами, относятся к широкому спектру структурных классов, таких как полициклические и ациклические алкалоиды [1-3], необычные липиды [4], полисульфиды, сульфатированные полиоксистероиды, пиридиновые нуклеозиды [5] и т.д. Недавно в морской губке Guitarra fimbriata нами был найден новый класс природных 5-азаиндолов, включающий необычное комплексное соединение 5-азаиндол-4-карбоксилата с алюминием [1]. Обсуждаются методы поиска, химическое разнообразие новых вторичных метаболитов, а также детали установления их структур и особенностей биологического действия.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 17-14-01065.

- 1. GuziiA.G., MakarievaT.N., DenisenkoV.A., GerasimenkoA.V., UdovenkoA.A., DmitrenokP.S., PopovR.S., GolotinV.A., FedorovS.N., GrebnevB.B., StonikV.A. // J. Nat. Prod. 2019.V. 82. N. 6. P. 17004–17009.
- 2. MakarievaT.N., OgurtsovaE.K., DenisenkoV.A., DmitrenokP.S., TabakmakherK.M., GuziiA.G., PislyaginE.A., Es'kovA.A., KozhemyakoV.B., AmininD.L., WangY.-M., StonikV.A. // Org. Lett. 2014. V. 16. N. 16. P. 4292–4295.
- 3. ShubinaL.K., MakarievaT.N., GuziiA.G., DenisenkoV.A., PopovR.S., DmitrenokP.S., StonikV.A. // J. Nat. Prod. 2018. V. 81. N. 4. P. 1113–1115.
- 4. GuziiA.G., MakarievaT.N., DenisenkoV.A., DmitrenokP.S., KuzmichA.S., DyshlovoyS.A., vonAmsbergG., KrasokhinV.B., StonikV.A. // Org. Lett. 2016. V. 1, N 14. P. 3478–3481.
- 5. ShubinaL.K., MakarievaT.N., YashunskyD.V., NifantievN.E., DenisenkoV.A., DmitrenokP.S., DyshlovoyS.A., FedorovS.N., KrasokhinV.B., JeongS.H., HanJ., StonikV.A. // J. Nat. Prod. 2015. V. 78. N. 6. P. 1383–1389.

Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН как основа для академических и прикладных исследований

В.В. Михайлов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: mikhailov@piboc.dvo.ru

Морские микроорганизмы составляют значительную часть биомассы Земли. Они также осуществляют более половины всей глобальной поставки кислорода, и, при этом, утилизируют значительную долю углекислого газа, который ускоряет глобальное потепление. Поэтому любые новые сведения о морских микроорганизмах являются важными и актуальными.

Для осуществления научного процесса необходимо, чтобы описанные или упомянутые в публикациях микробные штаммы были доступны для независимого изучения. Поэтому необходимо поддерживать и сохранять описанные и другие культуры, потенциально ценные для промышленности, медицины, сельского хозяйства и научных исследований. Эти важнейшие для микробиологов задачи выполняют коллекции культур, в которых собирают и постоянно поддерживают хорошо изученные, аутентичные штаммы вирусов, прокариот, грибов, а также культуры животных и растительных клеток. Микробные коллекции – это живые библиотеки, постоянный источник штаммов для сравнения. Коллекции культур выполняют также и роль экспертных центров в области систематики, таксономии, идентификации и хранения микроорганизмов. В знак признания коллекционного важности работ В области лела Международным микробиологических наук (IUMS) и Международным союзом биологических наук (IUBS) была создана Всемирная федерация коллекций культур (WFCC).

Многие страны поддерживают исследования в области морской микробиологии и биотехнологии. В России же, являющейся морской державой, такие исследования почти не ведутся. Исследования в области морской микробиологии ведутся в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) около тридцати лет. Эти исследования всегда были объединены единой тематикой: изучением фундаментальных биологических свойств и вытекающего из них экологического и биотехнологического потенциала морских микроорганизмов. В течение этого времени основной базой для академических и прикладных работ послужила основанная в 1985 г. Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (каталог, положение, ЦКП и другие сведения размещёны на сайте Института http://piboc.dvo.ru), которая является единственной в России, целиком специализирующейся на морских гетеротрофных бактериях, а также грибах-микромицетах. Коллекция является членом Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) (номер 644, официальный акроним – КММ) и получила международное признание. Она послужила основой для проведения академических и прикладных исследований в области морской микробиологии и биотехнологии. Исследования были сосредоточены на таксономии, экологии и продуцентах биологически активных веществ. Сотрудниками валидно описано около 250 новых видов бактерий и несколько видов грибов. Сведения о микроорганизмах в фундаментальной биоразнообразие↔экология↔биотехнология связке обнаружить ряд перспективных микробных продуцентов первичных и вторичных биоактивных метаболитов. Морские микроорганизмы таят в себе неисчерпаемые возможности. Здесь можно прогнозировать быстрые и важные достижения для социальноэкономического прогресса общества.

Нафтохиноидные пименты морских ежей и атмосферный кислород: химия взаимодействия

<u>В.Л. Новиков</u>, О.П. Шестак, Н.П. Мищенко, Н.Н. Баланева, Е.А. Васильева, В.П. Глазунов, В.А. Денисенко, Д.В. Бердышев, С.А. Федореев, А.А. Артюков

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: shestak@piboc.dvo.ru

Реакционная способность пигментов морских ежей с вицинальными ОН-группами в нафтазариновом скелете по отношению к атмосферному кислороду представляет особый интерес, поскольку на основе одного из них -2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона (эхинохрома A) созданы препараты серии Гистохром для использования в кардиологии и офтальмологии [1]. Водные растворы Гистохрома необходимо быстро использовать из-за того, что эхинохром A — действующее начало препарата — легко окисляется на воздухе. Представляло интерес выяснить, какие химические трансформации происходят с эхинохромом A в ходе его окисления атмосферным O_2 . Ранее нами было показано, что в среде различных растворителей при комнатной температуре сначала происходит недеструктивное окисление эхинохрома A в дегидроэхинохром с выбросом в среду молекулы H_2O_2 . Под действием молекул H_2O дегидроэхинохром гидратируется, образуя первый стабильный продукт окисления — 2,2,3,3,5,6,8-гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон (бис-*гем*-диол) **1** [2].

В растворе в 40%-ном EtOH бис-гем-диол 1 находится в равновесии с эквимольными количествами кето-гем-диолов 2 и 3, которые могут превращаться в нестабильный эпоксидиол 4. Перегруппировка последнего приводит к раскрытию кольца А бис-гем-диола 1. Образующийся интермедиат теряет далее один атом C в виде CO_2 и превращается в 1,5диальдегид, дающий начало всем выделенным в свободном состоянии продуктам деструктивного окисления кольца Α бис-гем-диола 1. Среди них обнаружены моноциклические продукты 5-14, отвечающие потере субстратом 1 одного, двух, трех и четырех атомов С, дигидроксибензохинон 16 и бициклический эхинолактон 17. Продукты 18-20, обнаруженные в смесях продуктов методом ВЭЖХ-МС, выделить пока не удалось. Обсуждаются механизмы образования всех продуктов окисления эхинохрома А.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021).

- 1. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Багирова В.Л. // Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37. № 1. С.49–51.
- 2. Новиков В.Л., Шестак О.П., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Федореев С.А., Глазунов В.П., Артюков А.А. // Изв. АН. Сер. хим. 2018. № 2. С. 282–290.

Неспецифические порины иерсиний и некоторых морских бактерий

О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, Д.К. Чистюлин, Н.Ю. Ким, Г.Н. Лихацкая, Е.А. Зелепуга, Л.А. Романенко, Т.Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: novolga 05@mail.ru

Одним ИЗ направлений исследований Лаборатории молекулярных антибактериального иммунитета является изучение структуры, функции и биологической активности OmpF и OmpC поринов иерсиний, β-структурированных белков, образующих систему трансмембранных водонаполненных каналов для неспецифической диффузии низкомолекулярных веществ. Выбор этих микроорганизмов в качестве объекта исследования был обусловлен тем, что в течение многих лет псевдотуберкулез прочно занимал высокое место в инфекционной патологии человека, в том числе в Приморском крае. Учитывая многообразие функций, осуществляемых поринами в бактериальной клетке. в ходе исследований была определена молекулярная структура поринов патогенных и человека видов иерсиний, установлена корреляция пространственной структурой и функциональной активностью этих белков, выявлена их роль в адаптации бактерий к изменению условий внешней среды, а также охарактеризованы иммунобиологические свойства поринов.

В данном сообщении представлен обзор выполненных нами работ, сочетающих экспериментальные и теоретические подходы и направленных на выяснение молекулярных механизмов функционирования конформационной пластичности И поринов. Оказалось, чтоучастки с повышенной "способностью" к агрегации в большей степени сосредоточенына внешней поверхности β-барреля OmpC порина Yersinia pseudotuberculosis. Выявлено существование двух мембраносвязанных форм OmpF порина Y. pseudotuberculosis (YpOmpF), тримера и мономера. Обнаружено, что только связывание тримеров может приводить к встраиванию молекулы белка в липидный бислой с последующим формированием проводящего канала. Применение расчетных методов позволило объяснить высокое значение критического потенциала закрытия каналов, образуемых OmpF порином Y. ruckeri (YrOmpF) по сравнению с таковым классического порина E. coli. Причиной этого является более жесткая конформация петли L3, находящейся внутри поры. Методом молекулярной динамики показано, что при повышении температуры определяющим фактором в сдвиге максимума эмиссии триптофана в спектре флуоресценции YrOmpF в длинноволновую область (в отличие от OmpC белка) является изменение пространственной ориентации остатка Тгр212. Совокупность данных, полученных с помощью SDS-ПААГ электрофореза, спектроскопических методов и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, позволила однозначно заключить, что диссоциации тримера YrOmpF предшествуют изменения в пространственной структуре мономеров.Серологическая перекрестная реактивность между YpOmpF и рецептором человека тиреостимулирующего гормона (hTSHR) подтверждена молекулярного моделирования. Обнаружено, что свободно взаимодействовать антителами к hTSHR может только мономер белка. При образовании тримера гидрофобная область, находящаяся в зоне взаимодействия порина с антителом, закрывается. Эти результаты in vitro и in silico подтвердили существование феномена молекулярной мимикрии. Из ряда морских протеобактерий (родов Pseudoalteromonas, Shewanella, Marinomonas) выделены пориноподобные белки. Обнаружен нелинейный характер зависимости величины проводимости их каналов от концентрации соли в водной фазе, что характерно для поринов морских бактерий.

Механизмы развития аутоиммунных заболеваний

Г.А. Невинский, К.С. Аулова, А.Е. Урусов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Электронная почта: nevinsky@niboch.nsc.ru

Рассеянный склероз (РС) известен как воспалительное и демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы. Экспериментальные мыши C57BL/6, склонные к спонтанному развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ), известны как модель рассеянного склероза у человека.

Нами показано, что при спонтанном развитии ЭАЭ и иммунизации мышей C57BL/6 с помощью MOG35-55 (фрагмент мышиного белка миелина), комплексов ЛНК с гистонами и метилированным бычьим сывороточным альбумином (мет-БСА) происходит изменение профилей дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и в зависимости от антигена возрастание или понижение уровня пролиферации лимфоцитов в различных органах (мозг, тимус, селезенка и лимфатические узлы). Эти процессы приводят к развитию ЭАЭ и ассоциированы с наработкой аутоантител против основного белка миелина (ОБМ), MOG, гистонов, ДНК и абзимов, гидролизующих эти субстраты. Проведено сравнение изменения указанных выше параметров при спонтанном и ускоренном ЭАЭ мышей после их иммунизации с помощью МОG, комплексов ДНК-гистоны и ДНК-мет-БСА. Иммунизация мышей всеми тремя антигенами ускоряет развитие ЭАЭ, но в каждом случае наблюдаются разные специфические изменения профилей дифференцировки ГСК. При этом при иммунизации мышей разными антигенами обнаружены как положительные (от +0.13 до +0.91), так и отрицательные (от -0.09 до -0.98) корреляции между титрами аутоантител против ДНК, МОС и гистонов с относительной активностью абзимов, гидролизующих эти субстраты. Обработка мышей с помощью MOG35-55 приводит к появлению острой фазы ЭАЭ в 7-20 дней после иммунизации. В отличие от МОС, иммунизация комплексом гистонов с ДНК ведет к подавлению протеинурии, значительному увеличению титров антител против ДНК, ОБМ, МОС, а также их каталитической активности в гидролизе этих антигенов. По сравнению с МОС, острая фаза ЭАЭ в случае комплексов ДНК-гистоны и ДНК-мет-БСА достигается позже; образование антител против ДНК и абзимов, гидролизующих ДНК, наблюдается с большой задержкой (15-20 дней). Данные указывают на то, что для мышей C57BL/6 различные комплексы ДНК с белками демонстрируют антагонистические эффекты по сравнению с МОG. ДНК-гистоны стимулируют появление гистонов-гидролизующих абзимов в острой фазе ЭАЭ, в то время как с активностью ДНКазы только в значительно более поздний период.

Впервые показано, что в зависимости от антигена в разные периоды развития ЭАЭ (начало (7 дней), острая фаза (18-20 дней) и ремиссия (25-63 дня) у мышей относительные количества вредных для них аутоантител с низкой и высокой каталитической активностью, а также без таковой значительно различаются. Показано, что профили дифференцировки ГСК у мышей, склонных к СКВ (MRL-lpr/lpr) и ЭАЭ (С57BL/6), при развитии этих патологий очень похожие.

Работа поддержана грантами РНФ № 16-04-00609 и № 19-15-00145.

- 1. Doronin V.B., Parkhomenko T.A., Korablev A. et. al. // J. Cell Mol. Med. 2016.V. 20. P. 81–94.
- 2. Aulova K.S., Toporkova L.B., Lopatnikova J.A. et.al. // J. Cell Mol. Med. 2017.V. 21. P. 3795–3809.
- 3. Doronin V.B., Korablev A., Toporkova et. al. // J. Neurol. Disord. 2017. V. 3. N 3. P. 1–13.
- 4. Aulova K.S., Toporkova L.B., Lopatnikova J.A. et al. // J. Cell Mol. Med. 2017. V. 21. N 12. P. 3795–3809.

Структурное разнообразие фукозилированных хондроитинсульфатов голотурий

А.И. Усов, М.И. Билан, Н.Е. Устюжанина, Н.Э. Нифантьев

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва Электронная почта: usov@ioc.ac.ru

Фукозилированные хондроитинсульфаты голотурий (FCS) [1] являются аналогами хорошо известных хондроитинсульфатов (CS), компонентов соединительной ткани наземных животных. Молекулы FCS имеют ту же, что и CS, линейную главную цепь с повторяющимися дисахаридными звеньями \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow , но отличаются от CS степенью сульфатирования, положением сульфатных групп и наличием ответвлений от главной цепи в виде α -L-фукозильных остатков или их димеров. Показано, что FCS, выделяемые из разных видов голотурий, различаются по строению [2,3]. В простейшем случае они представляют собой молекулы с трисахаридным повторяющимся звеном, причем регулярность структуры может быть нарушена различным расположением сульфатных групп в разных звеньях:

Примерами служат FCS из *Stichopus chloronotus* и *Stichopus horrens*, содержащие боковые остатки 2,4-дисульфата фукозы, а также FCS из *Massinium magnum*, содержащий 3,4-дисульфат фукозы. Высокая регулярность последнего убедительно демонстрируется его спектрами ЯМР.

Дифукозильные боковые цепи встречаются реже монофукозильных ответвлений. FCS из Ludwigothuria grisea содержит остатки α -L-Fuc- $(1\rightarrow 2)$ - α -L-Fuc3S- $(1\rightarrow$. Боковые заместители другого строения, α -L-Fuc- $(1\rightarrow 3)$ - α -L-Fuc4S- $(1\rightarrow$, были найдены в FCS из Holothuria lentiginosa. В голотурии Eupentacta fraudatrix обнаружены два разных FCS, содержащих дисахаридные остатки α -L-Fuc- $(1\rightarrow 2)$ - α -L-Fuc3S4S- $(1\rightarrow$. Полисахариды различаются тем, что в одном из них имеются остатки глюкуроновой кислоты, сульфатированные только по C-3, а в другом — по обоим положениям 2 и 3. Напротив, в FCS из Cucumaria djakonovi были обнаружены остатки глюкуроновой кислоты, вообще не содержащие фукозильных или сульфатных заместителей при C-2 и C-3.

Фукозильные боковые остатки могут занимать иногда положения 6 в остатках галактозамина. Такие FCS обнаружены в *Apostichopus japonicus*, *Actinopyga mauritiana*, *Holothuria mexicana*, *Holothuria scabra*. FCS из *Cucumaria frondosa* содержит в этом необычном положении полностью сульфатированный остаток фукозы.

Сравнительное изучение биологической активности FCS из разных видов голотурий, различающихся структурными параметрами, необходимо для установления корреляций между химическим строением и биологическими свойствами этих гликозаминогликанов и обнаружения веществ, пригодных для использования в практической медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-13-01325).

- 1. Pomin V.H. // Mar.Drugs. 2014. V. 12. P. 232–254.
- 2. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 2019. V. 476. P. 8–11.
- 3. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Nifantiev N.E., Usov A.I. // Pure Appl. Chem. 2019. htpps://doi.org/10.1515/pac-2018-1211.

Устные доклады Секция 1 Органический синтез природных соединений

Димерные полигидроксинафтазарины, метаболиты иглокожих и лишайников. Структура и синтез

В.Ф. Ануфриев, К.Л. Борисова, Г.И. Мельман, Д.Н. Пелагеев

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова РАН, Владивосток Электронная почта: anufriev@ piboc.dvo.ru

Соединения, в основе структуры которых лежит 1,4-нафтохиноидный остов, широко распространены в природе [1]. Из них, димерные (поли)гидроксинафтазарины, метаболиты иглокожих и лишайников, составляют относительно небольшую, но структурно разнообразную группу, к которой относятся производные 2,2'-бинафтилтетраона 1, 2,2'-метиленбинафтилтетраона 2, дибензоксантентетраонов 3a,b, дибензо[a,i]дибензо[b,e][1,4]диоксинтетраона 4 и динафтофурантетраона 5. Продукт, основой структуры которого является бензохроментетраон a, в морских ежах не обнаружен, однако возможно, что, в качестве минорного компонента, он присутствует в экстрактах, содержащих этилиденбиснафтазарин 7.

Первые представители этого ряда соединений были выделены в начале 70-х годов прошлого века, однако информация о выделении новых димерных продуктов этой группы, их синтезе появляется в печати и по сей день. В докладе обобщены данные о нахождении в природе, синтезе димерных (поли)гидроксинафтазаринов – метаболитов иглокожих и лишайников и ревизии структур некоторых из них. Первоначально, наши исследования коснулись синтеза соединений указанной группы, с целью получения их в количествах, необходимых для биоиспытаний. Однако выяснилось, что структуры некоторых синтезированных продуктов не соответствуют описанным в литературе. Знание точных структур веществ дает возможность установления корреляционных зависимостей структура-активность и, значит, направленного поиска соединений с заданными свойствами. Трудности, возникающие при установлении структур природных соединений, объясняются тем, что часто они доступны лишь в небольших количествах. Это затрудняет использование химических методов для установления структуры, а существующие на момент выделения физико-химические методы также не позволяют однозначно определить строение, в частности, взаимное расположение заместителей в коре изучаемых структур. В этой ситуации синтез, кроме поставщика веществ с заданной структурой, играет роль надежного инструмента их анализа. Другой причиной, затрудняющей анализ структуры, является лабильность выделяемых продуктов.

Осуществленные ранее синтезы димерных (поли)гидроксинафтазаринов, также представляют интерес. Воспроизведение некоторых из них, с целью получения продуктов в препаративных количествах, выявило некоторые особенности протекания реакций. Итогом этого явился синтез мирабихинона, метаболита морских ежей $Scaphechinus\ mirabilis$, производного дибензо[b,h]ксантентетраона $\bf 3b$, производных бензохроментетраона $\bf 6$, а также выявление особенностей реакции окислительного сочетания, приводящей к гибокарпону, метаболиту лишайника $Lecanora\ hybocarpa$, производному динафтофурантетраона $\bf 5$.

1. Thomson, R.H. *Naturally Occurring Quinones*; Acad. Press: London, N. Y., 1971; 2nd ed. pp. 734; Chapman & Hall: London, N. Y., 1987; 3rd ed. pp.732; Blackie Academic and Professional, London - New York,1997; 4th ed. pp. 746.

Усниновая кислота как платформа для синтеза биологически активных соединений

О.А. Лузина¹, А.С. Филимонов^{1,2}, Н.Ф. Салахутдинов^{1,2}

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск ²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,

Новосибирск

Электронная почта: luzina@nioch.nsc.ru

Усниновая кислота является уникальным и доступным метаболитом лишайников и обладает широким спектром биоактивных свойств, но использование её в фармакопее ограничено как из-за проявляемой в терапевтических дозах гепатотоксичности, так и в силу неспецифичности её действия. Одним из очевидных способов избежать неспецифичности является химическая дериватизация соединения, приводящая к усложнению молекулы и увеличению селективности её действия. При этом химическая модификация зачастую приводит к соединениям с более выраженными, чем у нативного метаболита, отдельными биологическими свойствами.

В ЛФАВ НИОХ СО РАН осуществлён синтез оптически активных полифункциональных соединений на основе двух энантиомеров усниновой кислоты. На базе природного дибензофуранового остова синтезированы вещества, являющимися высокоактивными противовирусными, противотуберкулёзными и противоопухолевыми агентами. Обнаружено, что производные усниновой кислоты с гидразинотиазольным заместителем обладают высокой ингибирующей активностью по отношению к ферменту репарации ДНК человека тирозил-ДНК-фосфодиэстеразе (Tdp1) и значительно усиливают противоопухолевый и анти-метастатический эффект топотекана *in vivo* в нетоксичных дозах [1].

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19-415-540002 и № 18-44-540023.

1. Zakharenko A.L., LuzinaO.A., SokolovD.N., KaledinV.I., NikolinV.P., PopovaN.A. etal. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 161. P. 581–593.

Синтез и противоопухолевая активность хинон-углеводных конъюгатов дионкохинона В и родственных соединений

<u>Д.Н. Пелагеев^{1,2}</u>, Е.А. Хмелевская^{1,2}, Ю.Е. Сабуцкий¹, С.А. Дышловой^{1,2}

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: pelageev@mail.ru

1,4-Нафтохиноны представляют собой важный класс органических соединений, которые распространены в растениях, морских беспозвоночных, грибах и бактериях. Эти соединения привлекают внимание исследователей благодаря широкому спектру фармакологических свойств. В частности, дионкохинон В (1) и родственные соединения 2-5, выделенные из различных наземных растений, представляют интерес благодаря их многообещающей противоопухолевой и противовоспалительной активности [1].

Ранее нами был разработан препаративный метод синтеза соединений **1-5** и их гомологов **6-8** [2]. С целью получения новых производных с улучшенной растворимостью и последующего изучения их биологических свойств нами было проведено тиометилирование 2-гидроксинафтохинонов **6-8** 6-меркапто производным глюкозы **9**. В результате с высокими выходами были получены ацетилированые конъюгаты **10-12**, в которых углеводный фрагмент присоединен к хиноидному ядра через метиленовое звено, что максимально повторяет строение природных хинонов **1-5**. Частичное метилирование тиопроизводных **10-11** диазометаном привело к конъюгатам **13-14**, а дальнейшее дезацетилирование дало производные **15-19** со свободным фрагментом глюкозы.

Введение фрагмента глюкозы в молекулу повышает растворимость в воде и Эффект Варбурга является общепризнанным явлением, биодоступность вещества. описывающим более высокое потребления глюкозы раковыми тканями. В связи с этим синтезированные соединения могут также обладать более высокой селективной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток [3]. Действительно, соединения, содержащие фрагмент глюкозы, проявляют более высокую активность на клетки рака простаты 22Rv1 по сравнению с нормальными клетками простаты PNT2. Следует отметить, что производные, содержащие остаток свободной глюкозы, проявляли более высокую ацетилированными селективность сравнению c аналогами, ацетилированного производного 14 индекс селективности равен 1,82 (35,5 / 19,5), тогда как для дезацетилированного аналога **19** был \geq 3,1 (> 100 / 32,1).

Табл. Цитотоксическая активность синтезированных соединений (IC₅₀, µM)

<u>№</u> соед.	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
22Rv1 (рак.)	>100	>100	>100	62,3±17,9	19,5±5,4	>100	>100	>100	>100	32,1±0,9
PNT2 (норм.)	>100	>100	>100	>100	35,5±2,1	>100	>100	>100	>100	>100

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-33-00460.

- 1. Bringmann G., Zhang G., Hager A., Moos M., Irmer A., Bargou R., Chatterjee M.// Eur. J. Med. Chem. $2011.\ V.\ 46.\ P.\ 5778-5789.$
 - 2. Khmelevskaya E.A., Pelageev D.N. // Tetrahedron Letters. 2019. V. 60. P. 1022–1024.
 - 3. Warburg O. // Science. 1956. V. 123. P. 309-314.

Синтез и биологическая активность тетрациклических тиогликозидных конъюгатов замещенных 1,4-нафтохинонов

<u>Ю.Е. Сабуцкий</u>, Е.С. Менчинская, Л.С. Шевченко, Е.А. Чингизова, Д.Л. Аминин, С.Г. Полоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: alixar2006@yandex.ru

Природные и синтетические 1,4-нафтохиноны проявляют противоопухолевую, антибактериальную, кардиопротективную и другие виды биологической активности, что делает эту группу веществ перспективной для поиска новых соединений-лидеров с целью дальнейшей модификации. Часто изучение и использование биологически активных нафтохинонов осложняется их плохой растворимостью. Ранее, ДЛЯ растворимости нами был разработан подход, в котором нафтохиноны конъюгировали с 1-меркаптопроизводными D-глюкозы, D-галактозы, D-маннозы, D-ксилозы и L-арабинозы и получили соответствующие ацетилтиогликозиды. Эти соединения под действием MeONa/MeOH легко дезацетилировались и превращались в тетрациклические конъюгаты линейного строения [1]. Было показано, что вновь полученные тетрациклы и их ацетилпроизводные проявляют цитотоксическую активность in vitro в отношении клеток лейкемии человека HL-60 в концентрациях 1.0-5.0 µM, при этом исходные ациклические ацетилтиогликозиды были в 10-100 раз менее активны [2].

В продолжение этих работ нами были получены новые тетрациклы $\underline{5}$ – $\underline{20}$, содержащие фрагменты 1-тиоглюкозы, галактозы, ксилозы и арабинозы, для которых исследовали противоопухолевую и антибиотическую активность. В качестве исходных соединений использовали производные 5,8-диметокси-1,4-нафтохинона и 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) $\underline{1}$ – $\underline{4}$, проявляющие выраженную противоопухолевую активность.

Цитотоксическую активность веществ исследовали на клетках асцитной карциномы Эрлиха, Neuro 2a, HeLa и Jb6. Было показано, что строение углеводной части тетрацикла мало влияет на проявление цитотоксической активности. Для всех исследованных клеточных линийнаибольшую активность ($EC_{50} \ge 0.3$ мкМ), показали тетрациклы, полученные из производных юглона $\underline{\mathbf{3}}$ и $\underline{\mathbf{4}}$. При этом все исследуемые тетрациклы не вызывали гемолиза эритроцитов мыши в концентрациях ≤ 25 мкМ.

Изучение антибиотической активности в отношении Escherichia coli KMM 431, Pseudomonas aeruginosa KMM 433, Staphylococcus aureus KMM 434, Bacillus subtilis KMM 430 и Candida albicans KMM 455 показало, что наибольшую активность проявляют тетрациклы, полученные из 2-бром-3-метоксиюглона3, которые были активны в отношении грамположительных культур S. aureus и B. subtilis в концентрациях 1.0–0.1 мг/мл, что сопоставимо с антимикробным действием коммерческих антибиотиков ванкомицина и гентамицина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-33-00492 мол_а) и РНФ (проект 19-14-00047).

- 1. Полоник С.Г., Денисенко В.А. // Изв. АН, сер. хим. 2009. Т. 5. С. 1034–1038.
- 2. Fedorov S.N., Shubina L.K., Kuzmich A.S., Polonik S.G. // Open Glycosci. 2011. V. 4. P. 1-5.

Дезоксихолевая кислота как платформа для синтеза новых ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

O.B. Саломатина^{1,2},И.И. Попадюк¹, А.Л. Захаренко², Jóhannes Reynisson³, Н.Ф. Салахутдинов^{1,4}, О.И. Лаврик^{2,4}, К.П. Волчо^{1,4}

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск
²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
³School of Pharmacy, Keele University, Hornbeam Building, Staffordshire
⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск
Электронная почта: ana@nioch.nsc.ru

Дезоксихолевая кислота – вторичная желчная кислота, которая является продуктом 7α-дегидроксилирования холевой кислоты кишечными бактериями. Структурные особенности строения дезоксихолевой кислоты обуславливают ее амфифильные свойства, что широко используется в медицинской химии для создания композиций, позволяющих увеличить биодоступность лекарственных агентов [1]. Наряду с транспортной функцией, дезоксихолевая кислота является лигандом рецепторов FXR и TGR5, оказывая существенное влияние на метаболизм глюкозы и липидов, а также участвует в регуляции сигнальных путей, связанных с процессами апоптоза, воспаления, и канцерогенеза [2-3]. Помимо всего вышесказанного, дезоксихолевая кислота является прекрасной стартовой платформой для химических трансформаций в силу доступности, дешевизны и высокой энантиомерной чистоты [4].

С использованием метода молекулярного моделирования нами впервые обнаружена

NH
$$R$$
 NH
 R
 NH
 R
 $R = Ar, Alk$

 $X={}^{\alpha}OH; {}^{\alpha}OAc; =O; {}^{\alpha}OR^{1} (R^{1=Me, Et, n-Pr)}$

способность производных желчных кислот, в том числе и дезоксихолевой, ингибировать фермент репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1. рассматривается как перспективная потенциальная мишень для вспомогательной терапии в комбинации с ингибиторами топоизомераз (топотекан, иринотекан и Ингибиторы топоизомераз действуют стабилизаторы ковалентных комплексов топоизомераза/ДНК, что приводит к накоплению

разрывов ДНК и клеточной гибели. Репарация ДНК с такими ковалентными аддуктами протекает с участием тирозил-ДНК-фосфодиэстераз на ключевых стадиях, поэтому присутствие в системе ингибиторов ферментов репарации ДНК позволяет решить проблему развития лекарственной устойчивости.

Комбинированной модификацией карбоксильной группы (амиды с различными функциональными группами в амидной части), а также стероидного остова (нативные гидроксильные и карбонильные группы, сложные и простые эфиры) нами была синтезирована библиотека соединений, позволяющая выявить зависимость «структура-биологическая активность» [5]. Исследования *in vitro* показали способность полученных соединений ингибировать фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу (значения IC_{50} для одноцепочечной ДНК от 0.1 до 7 мкМ), что в сочетании с такими свойствами, как низкая токсичность и синергия с топотеканом, показывает перспективность данного класса соединений для проведения углубленных фармакологических исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-13-00040.

- 1. Xiao L., Yu E., Yue H, Li Q. // Molecules 2019. V. 24. P. 1179
- 2. Lu T.T., Makishima M., Repa J.J. et. al. // Mol. Cell 2000. V. 6. P. 507-515.
- 3. Kast H.R., Nguen C.M., Sinal C.J., Jones S.A., Laffite B.A., Reue K., Gonzales F.J., Willson T.M., Edwards P.A. // Mol. Endocrinol. 2001. V. 15. P. 1720-1728.
 - 4. Попадюк И.И., Саломатина О.В., Салахутдинов Н.Ф. // Успехихимии. 2017. Т. 86. № 5. С. 388-443.
 - 5. Salomatina O.V., Popadyuk I.I., Zakharenko A.L. et.al. // Molecules 2018. V. 23. P. 679.

Секция 2 Структура и свойства низкомолекулярных природных соединений

Тритерпеновые гликозиды голотурий. Перспективы использования в биомедицине

Д.Л. Аминин

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: daminin@piboc.dvo.ru

В продолжение интенсивных и результативных исследований химических структур тритерпеновых гликозидов голотурий, проводимых в Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН, в 70-е годы прошлого столетия в Лаборатории биоиспытаний были начаты работы по изучению биологической активности этих веществ. Была подробно изучена их противомикробная, гемолитическая, эмбриотоксическая и цитотоксическая активности, влияние на синтез белка и нуклеиновых кислот в клетках. Были выявлены общие закономерности связи между химическим строением и биологической активностью тритерпеновых гликозидов голотурий, собранных в различных районах Мирового океана, определены основные принципы и индивидуальные особенности действия тритерпеновых гликозидов на структурно-функциональные биологических и модельных липидных мембран. С помощью техники ион-селективных электродов, БЛМ, дифференциальной сканирующей калориметрии, использования радиоактивных изотопов и ЭПР были установлены механизмы мембранолитического действия данных соединений. В основе цитотоксических свойств гликозидов лежит их способность взаимодействовать с Δ^5 -стеринами (главным образом, с холестерином) плазматических мембран и формировать ион-проводящие комплексы. В свою очередь это взаимодействие ведет к изменению ионной проницаемости и избирательности биомембран, нарушению барьерных свойств, ионного гомеостаза и осмолярности клеток, и далее к лизису клеток и их гибели. Показано, что причиной устойчивости клеток голотурий к собственным тритерпеновым гликозидам является очень низкое содержание в биомембранах свободных Δ^5 -стеринов и наличие вместо них свободных Δ^7 -стеринов, сульфатированных Δ^5 -стеринов и β -ксилозидов Δ^7 -стеринов. Обнаружено, что гликозиды голотурий принимают участие в регуляции гаметогенеза этих животных. Голотоксин А₁ синхронизирует мейоз ооцитов, осуществляя тем самым функцию половых гормонов созревания. Методами электрофизиологии, кальциевого имаджинга, ингибиторного анализа, нокдауна экспрессии генов с помощью siRNA, поверхностного плазмонного иммуноблотинга, конфокальной резонанса, ПЦР, микроскопии цитофлуориметрии доказаны молекулярные механизмы иммуномодулирующих свойств тритерпенового гликозида кукумариозида А2-2 и созданного на его основе препарата кумазид. Молекулярной мишенью действия гликозида являются пуринергические рецепторы Р2Х4 типа, обеспечивающие Са²⁺ проводимость в мембранах макрофагов и активацию клеток. Установлено, что тритерпеновые гликозиды голотурий (кукумариозид А2-2 и фрондозид А) в наномолярном диапазоне концентраций проявляют свойства цитостатиков, блокируют пролиферацию опухолевых клеток и клеточный цикл в S-фазе. Гликозиды вызывают апоптоз опухолевых клеток по каспазо-зависимому пути, минуя р53зависимый путь. Эти соединения и их комплексы с холестерином ингибируют активность мембранного Р-гликопротеина в опухолевых клетках и тем самым блокируют механизм мультилекарственной устойчивости клеток. Кукумариозид А2-2 вызывает поляризацию макрофагов в М1 фенотип, о чем свидетельствует появление специфических поверхностных СD-маркеров, усиленная продукция противоопухолевых молекул (ФНО-а, АФК, NO) и активация iNOs. Это приводит к усилению цитотоксических свойств макрофагов в отношении ряда линий опухолевых клеток in vitro и увеличению продолжительности жизни мышей с опухолью, которым проводили инъекции гликозидактивированных М1 макрофагов.

Полученные результаты показывают достаточно большой потенциал использования тритерпеновых гликозидов в качестве иммуностимуляторов и противоопухолевых средств, в том числе и при проведении клеточной противоопухолевой иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке Программы ДВО РАН "Дальний Восток", грант № 19-МНТ-017.

Новые сесквитерпеноиды каротановой группы из морского гриба Penicillium piltunense KMM 4668

O.И. Журавлева^{1,2}, Г.К. Олейникова², А.С. Антонов², Д.В. Бердышев², Ш.Ш. Афиятуллов²

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: ivchuk_olesya@mail.ru

В настоящее время морские грибы-микромицеты являются объектами повышенного внимания со стороны исследователей разных стран в связи с тем, что являются богатыми источниками новых метаболитов с уникальными химическими структурами, проявляющими разнообразную биологическую активность [1]. Продолжая поиск продуцентов биологически активных вторичных метаболитов среди морских изолятов микроскопических грибов, мы исследовали новый гриб *Penicillium piltunense* КММ 4668, выделенный из образцов грунта шельфа о. Сахалин возле б. Пильтун (Охотское море) [2].

Из этилацетатного экстракта культуры грибы *P. piltunense* KMM 4668 с помощью различных хроматографических методов были выделены семь новых сесквитерпеноидов каротановой группы, соединения **1-7**, а также (–)асперентин и 5'-гидроксиасперентин.

Структуры соединений были установлены методами одно и двумерной ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Абсолютные стереоконфигурации соединений были установлены сравнением экспериментальных спектров КД и рассчитанных с применением теории функционала плотности, а также на основании биогенетических соображений. Получены данные о цитотоксической, противоопухолевой, антибиотической и противовоспалительной активности выделенных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 19-74-10014.

- 1. Hasan S., Ansari M.I., Ahmad A., Mishra M. // Bioinformation. 2015. V. 11. P. 176–181.
- 2. Kirichuk N.N., Pivkin M.V., Matveeva T.V. // Mycol. Progress. 2017. V. 16. P. 15–26.

Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на основе низкомолекулярных природных соединений как потенциальные антираковые препараты

<u>А.Л. Захаренко¹</u>, О.А. Лузина², О.Д. Захарова¹, Н.А. Попова³, К.П. Волчо², Н.Ф. Салахутдинов², О.И. Лаврик¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск ³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск Электронная почта: a.zakharenko73@gmail.com

Исследования механизмов репарации ДНК и их регуляции тесно связаны с диагностикой и поиском способов лечения различных заболеваний, в том числе онкологических. Традиционная терапия онкологических заболеваний направлена на повреждение ДНК злокачественных клеток, и ее результат зависит от эффективности систем репарации ДНК. В настоящее время активно разрабатываются ингибиторы репарации ДНК для увеличения чувствительности опухолевых клеток к традиционным химиопрепаратам.

Один из перспективных ферментов-мишеней для лечения онкологических заболеваний – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) играет важную роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых ингибитором топотизомеразы 1 камптотецином и его клиническими производными топотеканом и иринотеканом, а также участвует в репарации повреждений ДНК, вызванных другими широко используемыми противораковыми препаратами, такими как этопозид, темозоломид и другими [1]. Предполагается, что именно Tdp1 ответственна за лекарственную устойчивость некоторых видов рака [2]. Эта гипотеза подтверждается рядом исследований: клеточные линии, имеющие мутацию SCAN1, уменьшающую активность этого фермента, или нокаутные по Tdp1, гиперчувствительны к камптотецину [1 и ссылки там]. Также при подавлении экспрессии Tdp1 с помощью миноциклина усиливается антиметастатический эффект иринотекана и увеличивается продолжительность жизни экспериментальных животных [3]. И наоборот, в клетках с повышенным уровнем экспрессии Tdp1 камптотецин вызывает меньше свидетельствуют о том, повреждений ДНК [4]. Эти данные сочетание противоопухолевых препаратов и ингибиторов Tdp1 может существенно повысить эффективность химиотерапии, a также способствовать преодолению проблемы резистентности опухолей.

Нами обнаружен широкий ряд ингибиторов Tdp1 — производных природных биологически активных веществ. Многие из обнаруженных соединений не обладают собственной цитотоксичностью в отношении перевиваемых клеточных культур. Два соединения-лидера протестированы *in vivo* на экспериментальных моделях карциномы лёгкого Льюис и асцитной карциномы Кребс-2 мышей, продемонстрировано существенное влияние на противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана [5,6].

Работа поддержана грантами РНФ №19-13-00040 и РФФИ № 17-04-01071.

- 1. Comeaux E.O., van Waardenburg, R.C. // Drug Metab. Rev. 2014. V. 46. P. 494–507.
- 2. Beretta G.L., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P. // Curr Med Chem. 2010. V. 17. P. 1500–1508.
- 3. Huang H.C., Liu J., Baglo Y., Rizvi I., Anbil S., Pigula M., Hasan T. // Mol. Cancer Ther. 2018 V. 17. P. 508–520.
- 4. Nivens M.C., Felder T., Galloway A.H., Pena M.M., Pouliot J.J., Spencer H.T. // Cancer Chemother. Pharmacol. 2004. V. 53. P. 107–115.
- 5. Koldysheva E.V., Men'shchikova A.P., Lushnikova E.L., Popova N.A., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Zakharenko A.L., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. V. 166. P. 661–666.
- 6. Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 161. P. 581–593.

Исследования полярных стероидов морских звезд: структуры, биологическая активность, биосинтез

<u>Н.В. Иванчина</u>, А.А. Кича, Т.В. Маляренко, В.А. Стоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: ivanchina@piboc.dvo.ru

Морские звезды (класс Asteroidea, тип Echinodermata) являются богатым источником разнообразных по своему химическому строению полярных стероидов, которые значительно отличаются от стероидных метаболитов наземных растений и других животных, в том числе от других стероидов морского происхождения, что свидетельствует о необычных путях их биосинтеза. К основным группам полярных стероидных соединений морских звезд относятся полигидроксистероиды и стероидные гликозиды. Большинство стероидных гликозидов являются олигогликозидами (астеросапонинами) и гликозидами полигидроксистероидов. Полярные стероидные соединения морских звезд могут встречаться как в сульфатированной, так и несульфатированной формах. Подобные полярным стероидам морских звезд соединения не найдены в других классах иглокожих (Crinoidea, Ophiuroidea, Echinoidea, Holothurioidea), поэтому они могут служить хемотаксономическими маркерами класса Asteroidea. Кроме того, интерес к этим соединениям связан с их разнообразной биологической активностью, они проявляют противомикробные, противовирусные, противоопухолевые, гемолитические, канцерпревентивные, нейритогенные и другие свойства.

Работы по изучению полярных стероидов морских звезд были начаты в ТИБОХ ДВО РАН в конце 70-х годов XX века. Первые публикации, касающиеся структур этих соединений, появились в начале 1980-х годов и касались выделения серии полигидроксистероидов и стероидного монозида астеросапонина Р₁ из дальневосточной морской звезды Patiria pectinifera. В настоящее время нашей группой из различных видов морских звезд, собранных в дальневосточных и тропических морях, выделено около двухсот новых полярных стероидов различных структурных классов, установлено их строение, включая абсолютную стереохимию, для ряда из них исследована биологическая активность. В последние годы нами найдены вещества, принадлежащие к редким структурным типам. Так, из морской звезды Echinaster luzonicus были выделены редкие циклические гликозиды лузоникозиды В-Е, их выделение почти вдвое увеличило число представителей этой уникальной структурной группы полярных стероидов. В морских звездах рода Anthenea найдены редкие антенозиды, например, антенозиды L-U из Anthenea aspera, и изучена их канцерпревентивная активность. Из морской звезды Choriaster granulatus выделен уникальный гранулатозид С – гликозид, в котором сочетаются характерные структурные особенности полярных стероидов из нескольких разных типов морских беспозвоночных. Недавно в морской звезде Pentaceraster regulus обнаружены астеросапонины пентарегулозиды В и С с фуростановыми агликонами, характерными для наземных растений, но не встречавшимися ранее в морских олигогликозидах. Пентарегулозид С проявил потенциальное иммуномодулирующее действие.

Впервые изучен биосинтез полигидроксистероидов и родственных им стероидных гликозидов морских звезд с помощью аквариальных экспериментов с мечеными стабильными изотопами — холестерином и сульфатом холестерина. Показано, что эти соединения при поступлении с пищей являются биосинтетическими предшественниками полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов. Кроме того, экспериментально установлено какие трансформации происходят в циклах A и В стероидного ядра при биосинтезе этих веществ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00034.

Исследование структуры тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

В.И. Калинин, С.А. Авилов, А.С. Сильченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: kalininv@piboc.dvo.ru

По предложению В.Е. Васьковского первоначально исследовали «морские» метаболиты тех классов, опыт изучения которых имелся. Первой в области тритерпеновых гликозидов голотурий была работа Елякова, Кузнецовой и Васьковского (1968 г.) о составе гликозидов Apostichopus japonicus. В 1973–1975 гг. изучили 43 вида голотурий из Тихого, Индийского и Атлантического океанов, установив таксономическую специфичность гликозидов. Вскоре начали применять спектроскопию ЯМР ¹³С и использовать хроматомасс-спектрометрические подходы к анализу продуктов метилирования сахаров. Шарыпов, Калиновская, Афиятуллов и др. установили строение нативных агликонов гликозидов из голотурий родов Stichopus, Astichopus и Thelenota, а также Eupentacta fraudatrix и Cucumaria *japonica*. Ряд нативных генинов получили методами мягкой химической ферментативной деградации. Для агликонов с 7(8)-двойной связью показали миграцию 7(8)-двойной связи в положение 8(9) и далее 9(11) при кислотном гидролизе. В агликонах гликозидов из семейства Holothuriidae, обладающих 9(11)-двойной связью и 12αгидроксилом, идет дегидратация с образованием 8(9),11(12)-диена, превращающегося в 7(8),9(11)-диен. Для агликонов из E. fraudatrix при щелочной обработке и при восстановлении 16-кето-группы в агликоне из С. japonica обнаружили перециклизацию 18(20)-лактона в 18(16)-лактон. Применение Мальцевым, Стоником и др. ферментативных и химических методов деградации углеводных цепей, включая деградацию по Смиту, в сочетании со спектроскопией ЯМР ¹³С позволило установить основные типы углеводных цепей для семейства Stichopodidae, в т.ч. биозидов, тетраозидов и разветвленных гексаозидов. Для семейства Holothuriidae основными типами оказались сульфатированные по С-4 первого ксилозного остатка биозиды и тетраозиды, а также гексаозиды. Подобные тетраозиды с терминальным остатком 3-О-метилксилозы Афиятуллов и др. нашли в E. fraudatrix. Авилов и др. нашли в C. japonica пентаозиды, разветвленные по C-2 второго сахара. Афиятуллов и др. нашли в *E. fraudatrix* аналогичные гликозиды. С начала 1980-х гг. исследования, в основном, переместились с отряда Aspidochirotida на отряд Dendrochirotida, где гликозиды отличались большим разнообразием. Эти голотурии обитают в основном в холодных водах, их сбор производили преимущественно в северной части Тихого океана драгированием. Изучались тропические голотурии этого отряда. Удалось найти новые типы агликонов, т.н. неголостановых производных, т.е. не содержащих лактона или с 18(16)лактоном вместо 18(20). Были обнаружены углеводные цепи, сульфатированные по С-6 остатков глюкозы и 3-О-метилглюкозы, а также другим положениям, отличным от С-4 первого ксилозного остатка. Удалось установить, что в разных отрядах голотурий эволюция гликозидов проходит параллельно и независимо, как в агликонах, так и в углеводных цепях, причем происходит увеличение цитотоксической активности и растворимости, а также выигрыш в метаболической цене. Это дает мозаичное разнообразие структур, образующих комбинаторные библиотеки. Был найден ряд закономерностей эволюции гликозидов, аналогичных морфологическим закономерностям.

Широкое использование ВЭЖХ, 2D-ЯМР и ВР масс-спектрометрии позволили охарактеризовать в последние годы многие десятки гликозидов, определив характер биосинтеза углеводных цепей как мозаичный, происходящий путем удлинения на один сахар с последующим сульфатированием, метилированием терминальных сахаров и т.д. Были обнаружены 3-О-метилглюкуроновая кислота и 3-О-метилхиновоза. Путем анализа минорных компонентов удалось уточнить начальные стадии биосинтеза агликонов, найти новые варианты окисления неголостановых агликонов, а также два агликона с новыми карбоциклическими системами, образовавшимися путем внутримолекулярной альдольной конденсации и перегруппировки Майнвальда.

Активность препаратов, содержащих эхинохром A, в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов

<u>Н.В. Крылова¹</u>, О.В. Иунихина¹, С.А. Федореев², Н.П. Мищенко², Е.А. Васильева², И.А. Ленева³, И.Н. Фалынскова³, Л.К. Эбралидзе³, В.Ф. Лавров³

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва Электронная почта: krylovanatalya@gmail.com

Возрастание доли вирусных инфекций в структуре общей инфекционной заболеваемости населения до 90% и отсутствие вакцинных и противовирусных препаратов при многих вирусных инфекциях является одной из самых серьезных проблем современного здравоохранения. В связи с этим, становится важным поиск новых, эффективных противовирусных средств с широким спектром действия, обладающих, в том числе, антиоксидантными свойствами.

Природный антиоксидант эхинохром A — хиноидный пигмент морских ежей — используется для получения российского препарата Гистохром[®], который применяется в кардиологии для лечения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, а также в офтальмологии для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки и роговицы глаз.

Мы обнаружили, что композиция препаратов, представляющая собой смесь эхинохрома A, аскорбиновой кислоты и α-токоферола (5: 5: 1), продемонстрировала более высокие антиоксидантные эффекты, чем каждый из ее компонентов (Fedoreyev S.A. etal., 2018). Нами было впервые показано, что природные антиоксиданты эхинохром A и композиция антиоксидантов на основе эхинохрома A обладают противовирусной активностью в отношении ДНК-содержащих вирусов простого герпеса 1 и 2 типа (ВПГ-1 и ВПГ-2) и РНК-содержащего вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Анти-ВКЭ и анти-ВПГ-1 активность эхинохрома A и его композиции оценивали в экспериментах *in vitro* (на культуре клеток СПЭВ и Vero, соответственно) по ингибированию цитопатического действия вирусов с помощью МТТ-анализа. Композиция антиоксидантов продемонстрировала более высокую противовирусную активность в отношении ВКЭ и ВПГ-1 по сравнению с эхинохромом А: селективные индексы композиции были в два раза выше, чем у эхинохрома.При изучении ингибирующего действия этих препаратов на разные стадии репликации ВКЭ и ВПГ-1 было установлено, что основным механизмом действия эхинохрома А и его композиции является прямая инактивация вирусных частиц (вирулицидное действие).

Анти-ВПГ-2 активность эхинохрома А и его композиции исследовали в экспериментах *in vivo* на модели генитального герпеса аутбредных мышей. Препараты вводили один раз в день в течение 5 дней после заражения. За животными наблюдали в течение 21 дня, средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей в контрольной группе составила 9,7 дней. Интраперитонеальное введение эхинохрома (1 мг/кг/день) обусловливало выживаемость 66,7% мышей, увеличивало СПЖ до 17,3 дней, ингибировало снижение массы тела и значительно уменьшало репликацию вируса в эпителии влагалища по сравнению с контрольной группой животных. При пероральном введении мышам композиции антиоксидантов (4 мг/кг/день) выживаемость составила 88,9%, СПЖ — 19,7 дней, изменения средней массы тела не отличались от таковых у интактных животных, титры вируса в вагинальных лаважах были незначительны.

Таким образом, наши результаты показывают, что эхинохром A и композиция антиоксидантов на его основе блокируют пролиферацию вирусов (ВКЭ, ВПГ-1 и ВПГ-2) in vitro и in vivo, что расширяет спектр фармакологической активности этих препаратов и может служить основой для создания противовирусных средств широкого спектра действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEF161317X0076).

Новые трисульфатированные стероиды из вьетнамской морской губки Halichondria vansoesti – ингибиторы экспрессии PSA и поглощения глюкозы

К.М. Табакмахер, Т.Н. Макарьева, В.А. Денисенко, Р.С. Попов, С.А. Дышловой

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: tabakmakher_km@piboc.dvo.ru

Биологически активные трисульфатированные стероиды являются характерными вторичными метаболитами некоторых морских губок [1]. В соответствии с особенностями строения стероидных ядер, их можно разделитьна несколько структурных подгрупп. В первую из них входят соединения, объединенные 2β,3α,6α-трисульфокси стероидным ядром (первый представитель – халистанол сульфат [2]). Соединения другой подгруппы $\Delta^{9(11)}$ -14 α -метил-2 β ,3 α ,6 α -трисульфатированное стероидное представитель – ибистерол сульфат [3]). Еще одна подгруппа объединяет в себе метаболиты с общим $\Delta^{9(11)}$ -4 β -гидрокси-14 α -метил-2 β ,3 α ,6 α -трисульфокси стероидным ядром (впервые обнаружено в топсентиастерол сульфатах А-Е [4]). Трисульфаты стероидов облалают многообещающими биологическими свойствами, антибактериальные, антимикотические, противовирусные, противопаразитарные антитромбоцитарные, ингибирование различных ферментов, стимулирование ангиогенеза и противоопухолевая активность [1]. Таким образом, поиск новых трисульфатированных стероидов из губок и исследование их химической структуры и физиологических свойств продолжает оставаться перспективной областью исследований и может привести к разработке лекарств нового поколения, проявляющих активность при широком спектре заболеваний. В ходе нашего продолжающегосяпоиска новых биологически активных морских вторичных метаболитов, было выделено 10 полисульфатированных стероидов из вьетнамской морской губки Halichondria vansoesti. С помощью методов 1D- и 2D-ЯМРспектроскопии, ВР-ИЭР-МС и химических превращений были определены их структуры. Было показано, что 6 соединений являются новыми аналогами топсентиастерол сульфатов характерные $\Delta^{9(11)}$ -4β-гидрокси-14 α -метил-2 β ,3 α ,6 α -трисульфатированные стероидные ядра и необычные боковые цепи, впервыенайденныев трисульфатах стероидов из губок. Одно соединение представляет собой новый аналог халистанол сульфатов, содержащий, ранее не встречавшееся в соединениях этого класса, 4β-гидрокси-2β,3α,6αтрисульфатированное стероидное ядро и является первым представителем новой структурной подгруппы этихметаболитов. Были идентифицированы 3 выделенных соединения, как ранее описанные хлоропсентиастерол сульфат D, иодопсентиастерол сульфат D [6] и топсентиастерол сульфат D [4]. Была предложена схема гипотетических путей биосинтеза боковых цепей новых топсентиастерол сульфатов. Было показано, что некоторые из выделенных метаболитов способны подавлять экспрессию PSA и поглощение глюкозы в клетках рака предстательной железы человека и, таким образом, могут служить исходными соединениями для создания новых лекарств от рака предстательной железы.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №18-53-54002 Viet-a и гранта РНФ № 18-74-10028.

- 1. Carvalhal F., Correia-da-Silva M., Sousa E., Pinto M., Kijjoa A. // J. Mol. Endocrinol.2018. V. 61. P. 211–231.
 - 2. Fusetani N., Matsunaga S., Konosu S. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. P. 1985–1988.
- 3. McKee T.C., Cardellinaii J.H., Tischler M., Snader K.M., Boyd M.R. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 389–392.
 - 4. Fusetani N., Takahashi M.; Matsunaga S. // Tetrahedron. 1994. V. 50. P. 7765–7770.
- 5. Tabakmakher K.M., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., Grebnev B.B., Bokemeyer C., von Amsberg G., Cong N.X. // Mar. Drugs. 2019, (отправлено в печать).
- 6. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Burtseva Y.V., Krasokhin V.B., Stonik V.A. // Tetrahedron Lett. 2008. V. 49. P. 7191–7193.

Водорастворимые изофлавоноиды из корней Maackia amurensis

С.А. Федореев, Н.И. Кулеш, М.В. Веселова, Д.В. Тарбеева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: fedoreev-s@mail.ru

Из полифенольного комплекса древесины растения *М. amurensis* получают субстанцию препарата Максар[®], разработанного ТИБОХ ДВО **PAH** зарегистрированного в Российской Федерации в качестве гепатопротективного средства (P N003294/01). Для более эффективного применения уникального реликтового растения M. amurensis в фармацевтической промышленности важно было оценить возможность использования других органов растения, например корней, в качестве альтернативного самовозобновляемого источника сырья для создания лекарственных средств. Корни в отличие от древесины растения M. amurensis, содержат комплекс, состоящий из 12 гликозидных форм изофлавонов И птерокарпанов. И обладает выраженными антиоксидантными и гепатопротективными свойствами [1,2]. При CCl₄-гепатите он нормализует показатели липидного обмена печени [1], способствует снижению активности маркерных ферментов цитолиза и удельной массы печени, обеспечивает сохранение уровня глюкозы в крови и окисленных никотинамидных коферментов.

В экспериментах на животных изофлавоноиды из корней *М. amurensis* снижали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов [3] и существенно изменяли показатели коагуляционного гемостаза, удлиняя тромбопластиновое время, уменьшая коагуляцию и свертывание крови, увеличивал протромбиновое время [3].

Из коры корней *М. атигенsis* в дополнение к ранее известным 12 гликозидам изофлавонов и птерокарпанов мы выделили еще семь изофлавоноидов, включая пять новых гликозидов. Их структуры установлены как 4'-*O*-гентиобиозид даидзина (1), 4'-*O*-β-D-глюкопиранозид 7-*O*-гентиобиозилдаидзеина (2), 4'-*O*-β-D-глюкопиранозид 7-*O*-гентиобиолгенистеина (4), 7-*O*-гентиобиозид 3'-метоксидаидзеина (6) и 7-*O*-гентиобиозид каликозина (7). 4'-*O*-β-D-глюкопиранозид даидзина (3) и 4'-*O*-β-D-глюкопиранозид генистина идентифицированы в корнях *М. атигеnsis* впервые.

$$RO$$
 — R_1 — R_2 — R_3 — R_4 — R_5 — R_5

Таким образом, изучен полный химический состав комплекса гликозидов из коры корней *М. amurensis*. Этот комплекс гликозидов обладает гепатопротективной активностью и способен ингибировать ряд показателей тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в условиях энтерального введения. Следовательно, существует перспектива создания на его основе нового гепатопротективного средства по эффективности не уступающего препаратам Максар[®] и Карсил[®] и способного уменьшать вероятность возникновения тромбозов при различных сердечно-сосудистых заболеваниях.

- 1. Кулеш Н.И., Федореев С.А., Веселова М.В., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. // Хим.-Фарм. журнал. 2016. Т. 50. С. 21–27.
- 2. Kulesh N.I., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Zverev Ya.F., Zamyatina S.V. // Natural Product Communications. 2013. V. 8. P. 589–592.
- 3. Зверев Я.Ф., Федореев С.А., Кудинов А В., Тарбеева Д.В., Кулеш Н.И., Григорчук В.П., Замятина С.В. // Тромбоз, гемостаз и реология. 2018. Т. 74. С. 78–87.

Биологически активные метаболиты гриба *Penicillium* sp. KMM 4672

А.Н. Юрченко, Е.А. Юрченко, Е.Г. Ефимова, Е.В. Иванец

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: yurchant@ya.ru

Морские микроскопические грибы – перспективные источники новых биологически активных соединений [1]. Различные условия окружающей среды являются одними из важнейших факторов, влияющими на метаболизм грибов-микромицетов [2]. Тропические моря отличаются высокой температурой воды и большой плотностью бактериальной микрофлоры, что определяет высокую конкурентность подобных условий для морских грибов. Несмотря на интенсивное изучение грибов из различных субстратов Южно-Китайского моря группами китайских ученых, их интерес ограничивается в основном побережьями Тайваньского пролива и острова Хайнань. Между тем, гораздо более протяженное побережье Вьетнама остается практически неизученным.

Гриб *Penicillium* sp. KMM 4672 был выделен с поверхности бурой водоросли Padina sp., собранной в заливе Ванфонг во время 38 рейса НИС Академик Опарин. Ранее из этого штамма нами были выделены несколько новых тиодикетопиперазиновых алкалоидов совместно с рядом известных метаболитов различных классов [3]. В рамках нынешнего проекта были изучены минорные соединения в экстракте этого гриба. С помощью хроматографических различных методов были выделены четыре новых 2,5дикетопиперазина – цитриперазины А-D (1-4), одно новое β-оксотриптаминовое производное 5, а также известные грибные поликетиды -3-метилорселлиновая кислота (6), 4-гидроксискиталон (7), 4-гидрокси-6-дегидроксискиталон (8), деметилцитреовиранол (9), структуры которых были установлены методами одно и двумерной ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Абсолютные стереоконфигурации соединений **1-4** были установлены сравнением экспериментальных спектров КД и рассчитанных с применением теории функционала плотности. Получены данные о цитотоксической, антиоксидантной и нейропротекторной активности выделенных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований: грант 18-34-00621 (химические исследования), грант 18-34-00737 (нейропротекторная и антиоксидантная активности).

1. Uzma F., Mohan C.D., Hashem A. et al. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9, No. APR. 309

73.

- 2. Sridhar K.R. In Developments in Fungal Biology and Applied Mycology Springer Singapore: 2017; pp 59-
- 3. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Ivanets E.V. et al. // Mar. Drugs. 2016. V. 14, No. 7. P. 122.

Нейропротекторная активность метаболитов губки Penare sp.

Е.А. Юрченко, Е.С. Менчинская, Е.А. Пислягин, Е.Г. Ляхова, С.А. Колесникова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Белякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: dminae@mail.ru

Целью работы было исследовать нейропротекторную активность выделенных ранее метаболитов губки *Penares* sp. [1].

Из изученных тритерпеноидов только соединение **1** оказало некоторое влияние на жизнеспособность клеток Neuro2a (ЭД₅₀ 85,7 μ M), вещества **2-5** были нетоксичны. В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали концентрации веществ 1 и 10 μ M.

Нейропротекторная активность была изучена в двух клеточных моделях болезни Паркинсона — индуцированных нейротоксинами 6-гидроксидофамином (6-OHDA) и паракватом. Все изученные тритерпеноиды 1-5 снижали уровень активных форм кислорода $(A\Phi K)$ в клетках, обработанных 6-OHDA, до нормального уровня, однако при этом не оказывали влияния на жизнеспособность этих клеток, определенную МТТ методом.

Соединение 1 не влияло на уровень АФК в клетках, обработанных паракватом, в то время как соединения 2 и 3 снижали его до контрольного уровня в концентрации $10~\mu M$, а 4 и 5 — в концентрациях 1 и $10~\mu M$. Соединение 1 в концентрации $10~\mu M$ не влияло на жизнеспособность клеток, инкубированных с паракватом, но при уменьшении концентрации в $10~\mu M$ увеличивало их жизнеспособность на 21%. Также жизнеспособность клеток увеличивалась на $18~\mu 22\%$ под действием ацетилпенастерола (5) в концентрациях $1~\mu 10~\mu M$ соответственно. Соединения 2-4 были неактивны. Очевидно, что в случае этих соединений ацетилирование 3β -гидроксильной группы приводит к усилению их нейропротекторных свойств. При этом прямой связи между антиоксидантым действием веществ и увеличением жизнеспособности клеток в модели болезни Паркинсона, вызванной паракватом, обнаружено не было.

Также было детально изучено нейропротекторное влияние веществ **1-5** на некоторые морфологические признаки клеток Neuro2a, инкубированных с паракватом. Все соединения не влияли на среднюю длину отростков нервных клеток, но в разной степени увеличивали количество клеток с отростками и среднее количество отростков у одной клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00737.

1. Kolesnikova S.A., Lyakhova E.G. et al. // J. Nat. Prod. 2013. V. 76. P. 1746–1752.

Секция 3 Биополимерные природные соединения

Сульфатированные стероиды губок семейства Halichondriidae— природные ингибиторы ферментов бактерии Formosa algae, расщепляющей полисахариды бурых водорослей

А.А. Белик, К.М. Табакмахер, А.С. Сильченко, Т.Н. Макарьева, Т.Н. Звягинцева,

С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: belikpiboc@gmail.com

Ингибиторы необходимы для выяснения механизма действия ферментов, установления структуры субстратов, роли ферментов и их субстратов в сосуществовании различных организмов, занимающих одну и ту же экологическую нишу. Халистанол сульфат (1) известен как соединение, представляющее собой ингибитор необратимого типа по отношению к эндо-1,3-β-D-глюканазам морских моллюсков [1]. Близкие ему по химической структуре топтсентиастерин сульфат D (2) и хлоротопсентиастерин сульфат D (3) также показали способность ингибировать эндо-1,3-β-D-глюканазу из морского моллюска *Pseudocardium sachalinensis* [2].

Целью данной работы было изучение действия сульфатированных стероидов **1-3** из губок семейства Halichondriidae на рекомбинантные бифункциональную альгинат-лиазу ALFA3 [3], фукоиданазу FFA2 [4] и эндо-1,3-β-D-глюканазу GFA [5] морской бактерии *Formosa algae* KMM3553^T, участвующих в деградации полисахаридов бурых водорослей.

Ингибирование GFA соединением (1) составило 59%. Для микробиальной эндо-1,3-β-D-глюканазы (1) является обратимым ингибитором конкурентного типа, тогда как для ферментов морских моллюсков такой же специфичности (1) является необратимым ингибитором [1]. Соединение (2) является для GFA слабым ингибитором, ингибирование составило 38%. Соединение (2) отличается от (1) наличием дополнительной гидроксильной группы в стероидном ядре и пятичленного кольца в боковой цепи. Присутствие этих групп меняет бифильность стероида, ослабляет его ингибирующее действие. Наличие хлора в (3) повышает гидрофобность боковой цепи и вызывает практически полное ингибирование GFA. Более того, наличие хлора в (3) изменяет по сравнению с (1) тип ингибирования с обратимого на необратимый.

Ингибирование ALFA3 соединениями **1-3** также происходит по различным механизмам и сильно зависит от структуры ингибитора. Так, (**1**) обеспечивает полное и необратимое ингибирование фермента, (**2**) обеспечивает частичное ингибирование, (**3**) полностью ингибирует ALFA3 при концентрации ингибитора 0,46 мМ. Соединения **2-3** демонстрируют обратимый тип ингибирования. Можно отметить полное ингибирование ALFA3 соединением (**3**), необычное для обратимого ингибитора.

Действие соединений **1-3** на FFA2 во всех случаях приводило к полному и необратимому ингибированию, что, возможно, объясняется сложностью пространственной структуры данного фермента, уязвимой для инактивирующих изменений конформации полипептидной цепи вследствие межмолекулярного взаимодействия с молекулами сульфатированных стероидов.

Работа по установлению структур и механизмов действия ферментов выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00905_а, работа по выделению и структурному исследованию сульфатированных стероидов - при поддержке гранта РФФИ №18-53-54002 Вьет_а.

- 1. Zvyagintseva, T.N., Makareva, T.N., Stonik, V.A., et.al. // Chem. Nat. Compd. 1986. V. 22. N 1. P. 66–71.
 - 2. Guzii, A.G., Makarieva, T.N., Denisenko, V.A., et. al. // Tetrahedron Lett. 2008. V. 49. P. 7191–7193.
- 3. Belik A. A., Silchenko A. S., Malyarenko O. S., et. al. // ВестникДВОРАН. 2018. № 6, suppl. C. 24–25. doi:10.25808/08697698.2018.- 202.6S.006.
 - 4. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., et. al. // Glycobiology. 2017. V. 27. P. 254–263.
 - 5. Kusaykin M.I., Belik A.A., Kovalchuk S.N., et. al. // World J. Microb. Biot. 2017. V. 33. N 2. P. 12.

Временная экспрессия генов поринов и фенотипическая гетерогенность популяции Yersinia pseudotuberculosis в условиях стресса

 $E.\Pi.$ Быстрицкая¹, А.В. Ракин², М.П. Исаева¹

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Институт им. Макса фон Петтенкофера Университета Людвига Максимилиана, Мюнхен, Германия

Электронная почта: belyjane@gmail.com

Одной из стратегий защиты бактерий от неблагоприятных условий является изменение проницаемости наружной мембраны, которая обеспечивается регулируемой соответствующих экспрессией белков неспецифических поринов. адаптивной физиологическая реакция может приводить формированию К антибиотикорезистентности и поэтому представляет особый интерес [1]. Известно, что изменение уровня экспрессии генов поринов в условиях стресса является быстрым обратимым ответом бактерии, который действует ограниченное время, уступая место другим защитным механизмам [2]. Целью данной работы являлась оценка длительности транскрипционного ответа OmpF и OmpC поринов Y. pseudotuberculosis, возбудителя псевдотуберкулеза, при адаптации бактерии к антибиотиковому стрессу.

В качестве объекта исследования был выбран штамм *Y. pseudotuberculosis* 488, циркулирующий на Дальнем Востоке. Для создания стресса использовали сублетальную концентрацию антибиотиков разных классов (карбенициллина, тетрациклина и канамицина). Изменение экспрессии *OmpF* и *OmpC* оценивали с помощью методов количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени и проточной цитофлуориметрии с использованием репортерных конструкций на основе GFP.

В результате анализа данных ПЦР была обнаружена значительная разница в транскрипционном ответе Отр и Отр в зависимости от времени воздействия антибиотиков. Непродолжительная инкубация с канамицином и тетрациклином приводила к формированию стрессового ответа бактерии путем снижения экспрессии Отрь, Отрь, тогда как карбенициллин не оказывал существенного влияния на уровень транскриптов главных поринов Y. pseudotuberculosis. При длительном воздействии антибиотиков транскрипционный ответ Отр и Отр отсутствовал, что свидетельствует о возможном участии пориновых генов в адаптации к другим стрессам, связанным со стационарной фазой роста бактерии, И вовлечению на данном этапе других механизмов антибиотикорезистентности. В результате цитофлуориметрического анализа экспрессии обнаружено явление фенотипической гетерогенности поринов было Y. pseudotuberculosis. Такие фенотипические различия могут способствовать формированию адаптивной антибиотикорезистентности у определенной субпопуляции внутри изогенной культуры за счет ее преимуществ в выживании в стрессовых условиях [3].

- 1. Rizi K.S., Ghazvini K., Noghondar M. // J. Infect. Dis. Ther. 2018. V. 6. N 3. P. 363.
- 2. Fernández L., Hancock R. // Clin, Microbiol, Rev. 2012. V. 25. N 4. P. 661–681.
- 3. Sánchez-Romero M., Casadesus J. // PNAS. 2014. V. 111. N 1. P. 355–360.

Тернистый путь определения роли Wnt сигналинга у голотурий

А.С. Гирич, К.А. Садриев

Национальный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

Электронная почта: astromoon@mail.ru

Исследование морских беспозвоночных дает огромное количество уникальных знаний и возможностей применения этих знаний в практических основах. Ответственность за формирование уникального биологического объекта несут гены, которые определяют каким будет формирующийся организм. Голотурии уникальны в своей особенности регенерировать утраченные органы: от отдельных структур, до половины тела. При этом в отсутствии клеток гонад или кишечного эпителия, голотурии способны создать их, проведя дедифференцировку клеток стенки тела. Также стенка тела голотурий уникальна из-за способности к размягчению: в опасности стенка тела голотурий достаточна тверда и с трудом прокалывается стальной иглой, однако при необходимости размягчается, так что голотурия, имеющая 1-1,5 см в диаметре способна просочиться через отверстия диаметром в 3 мм, либо же размягчиться для выбрасывания инородного тела из полости тела. Природа этих уникальных свойств голотурии до недавних пор изучалась в основном цитологическими методами, однако последние несколько лет начали проводиться работы для исследования молекулярных основ.

Чтобы понять какие гены/белки запускают тот или иной процесс для начала необходимо провести общий анализ, выявив все активные гены. Наиболее удобным и простым методом является анализ транскриптома, в котором выявляются гены, которые активны в том или ином органе. Так мы выявили, что при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* экспрессируются гены Wnt сигналинга. Этот сигнальный путь важен в эмбриогенезе всех многоклеточных, для определения передне-задней оси тела, однако его роль в регенерации не выяснена. Поэтому на втором этапе исследований мы получили последовательности транскриптов большинства генов лигандов *wnt*и рецепторов *frizzled*, и провели анализ их экспрессии методом Real-timePCR, которым выявили, что наибольшую активность проявляют гены: *wntA*, *wnt4*, *wnt5*, *wnt6*, *frizzled1/2/7*, *frizzled4*.

Однако увеличение уровня экспрессии не дает возможности судить о том, какие функции во всем сложном процессе выполняет исследуемый ген. Следующим этапом исследования является WMISH метод для выявления локализации экспрессии генов. Так мы выявили, что экспрессия исследуемых генов происходит в стенке тела, в амбулакральной системе и целомическом эпителии.

Кроме исследований генов, необходимо также подтвердить наличие белка. Для этого был использован метод иммуноцитохимии с синтезом искусственного полипептида и получения на него поликлональных антител. С помощью них было выявлено, что белок Wnt4 накапливается в клетках, находящихся в соединительной ткани стенки тела и формирующегося регенерата, а белок WntA обнаружен лишь в небольшом количестве клеток в стенках тела.

На последнем этапе работы необходимо заблокировать экспрессию гена для выявления эффекта. Так мы произвели нокдаун по гену *frizzled1/2/7* в регенерирующей голотурии с помощью *in vivo* электропорации, результатом чего стало уменьшение размера регенератов.

Таким образом, используя множество различных методических подходов, мы выявили, что wnt сигналинг необходим голотуриям в нормальной жизни и при регенерации. На основе полученных данных можно предположить, что исследуемый сигнальный путь участвует в координации миграции клеток и своевременном запуске регенераторной программы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00170

Полиэлектролитные комплексы хитозан-каррагинан и их мукоадгезивные свойства

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

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: viktoria@piboc.dvo.ru

Хитозан (XH) широко используется для получения наночастиц, пленок и гелей, для создания на их основе систем доставки биологически активных соединений. Наночастицы на основе XH и его производных способны защищать лекарственные препараты от кислотной денатурации, ферментативной деградации, а также пролонгировать время нахождения активной субстанции в тонкой кишке. В то же время более перспективными являются композитные матрицы на основе полиэлектролитных комплексов (ПЭК), полученных при взаимодействии XH с полианионами.

В качестве полианиона для получения ПЭК мы использовали полисахарид красных водорослей – каррагинан. Каррагинаны (КН) являются сульфатированными галактанами, безопасность использования которых в пищевых и медицинских целях подтверждена многочисленными исследованиями в экспериментах *in vivo*. Широкий структурный дизайн, ионная специфичность, плотность заряда и способность перехода спираль-клубок обеспечивает самый разнообразный спектр физико-химических и биологических свойств этих полисахаридов и возможность их использования в комплексе с поликатионами. В настоящей работе на основании ХН и к/β-КН получены две формы ПЭК: пленки и наночастицы.

Трехслойные пленки были сформированы методом послойного нанесения полисахаридов и содержали XH, к/β-КH, и их ПЭК, образующийся между слоями двух полиионов. В качестве образцов сравнения были использованы пленки, полученные на основе исходных полисахаридов.

Для изучения мукоадгезивных свойств пленок в качестве слизистой ткани была использована свежезамороженная внутренняя поверхность тонкого кишечника свиньи. Мукоадгезивные свойства оценивали по набуханию пленки и степени ее эрозии после контакта со слизистой тканью. Максимальное набухание наблюдалось для пленки из чистого КН. При связывании КН с XH его способность к набуханию на слизистой значительно снижалась, что, вероятно, обусловлено изменением макромолекулярной структуры полианиона в результате образования ПЭК. Для пленки к/β-КН и для трехслойных пленок, содержащих ПЭК, наблюдалось увеличение массы пленки при ее высушивании, что, вероятно, происходит в результате образования прочных связей между полисахаридами пленки и поверхностью муцинового гликопротеинового слоя, что приводит к частичному удалению муцина вместе с пленкой. Эти данные свидетельствуют о наличии мукоадгезивных свойств у полученных пленок.

Мукоадгезивные свойства растворимых форм ПЭК были оценены по их способности взаимодействовать с муцином тонкой кишки свиньи путем измерения размера и поверхностного потенциала ПЭК и исходных полиионов в водном растворе и в растворе, содержащем муцин. При инкубации как полисахаридов, так и их ПЭК в растворе, содержащем муцин, наблюдалось образование частиц с мономодальным распределением по заряду, значение которого было меньше, чем для исходных компонентов. При этом величина ζ-потенциала не равнялась сумме значений заряда муцина и исходных компонентов, что свидетельствует о наличии мукоадгезивных свойств у растворимой формы полиэлектролитных комплексов.

Полученные данные позволяют рассматривать ПЭК XH/KH в качестве матриц для неинвазивных форм доставки лекарственных средств.

Фукоиданы из бурой водоросли Fucus evanescens: структура и биологическое действие

<u>С.П. Ермакова¹</u>, А.С. Сильченко¹, О.С. Маляренко¹, А.Б. Хмельков¹, Р.В. Усольцева¹, М.И. Кусайкин¹, Л.А. Иванушко², А.Л. Шутикова², Т.Н. Звягинцева¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток Электронная почта: ermakova@piboc.dvo.ru

Широко распространенная в дальневосточных морях России бурая водоросль *Fucus evanescens* является ценным источником сульфатированных полисахаридов — фукоиданов, проявляющих различные виды биологической активности. Установлено, что наиболее гомогенная фракция фукоидана из F. *evanescens* построена из повторяющихся дисахаридных блоков: $[\rightarrow 3)$ - α -L-Fucp($20SO_3$)-10-10-10-10-C-Fucp($20SO_3$)-10-10-10-C-Fucp($20SO_3$)-10-10-C-Fucp($20SO_3$)-10-C-Fucp($20SO_3$)-10-C-

С помощью ферментативной трансформации был получен фукоидан с регулярной структурой [\rightarrow 3)- α -L-Fucp(2,4OSO₃ $^-$)-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fucp(2,4OSO₃ $^-$)-(1 \rightarrow]_n [2]. Использование ультразвуковой экстракции позволило выделить α -L-фукан регулярного строения [\rightarrow 3)- α -L-Fucp(2OSO₃ $^-$)-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fucp(2OSO₃ $^-$)-(1 \rightarrow], ацетилированный по положению C3 остатков фукозы [3].

Целью доклада является обобщение опубликованных данных о структуре фукоиданов из F. evanescens [1–3], их биологической активности [4–6] и практическом применении [7].

Работа выполнена при поддержке Гранта РНФ №16-04-10131.

- 1. Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Malyarenko O.S., Zaporoshets T.S., Besednova N.N., Ermakova S.P. // Front. Mar. Sci. 2016. V. 3. N 39. P. 129.
- 2. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Malyarenko O.S., Shevchenko N.M., Zueva A.O., Kalinovsky A.I., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 193. P. 189–195.
- 3. Hmelkov A.B., Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Rasin A.B., Ermakova S.P. // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. N 3. P. 2039–2046.
- 4. Vishchuk O.S., Sun H.M., Wang Z., Ermakova S.P., Xiao J.J., Lu T., Xue P.P., Zvyagintseva T.N., Xiong H., Shao C., Yan W., Duan Q.H., Zhu F. // Oncotarget. 2016. V. 7. N 14. P. 18763–18773.
- 5. Шутикова А.Л., Иванушко Л.А., Маляренко О.С., Ермакова С.П. // Здоровье. Мед. экология. Наука. 2017. \mathbb{N}_2 3 (70). С. 102–105.
- 6. Malyarenko O.S., Zdobnova E.V., Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Ermakova S.P. // Carbohydr. Polym. 2019. V. 205. P. 465–471.
 - 7. Имбс Т.Н., Звягинцева Т.Н., Ермакова С.П. // Вестник ДВО РАН. 2015. № 6 (184). С. 145–149.

Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей – ингибиторы фукоиданаз

Т.И. Имбс, А.С. Сильченко, Т.Н. Звягинцева, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: tatyanaimbs@mail.ru

Поиск и изучение ингибиторов ферментов является актуальной задачей современной энзимологии. Сведения об ингибиторах ферментов, функционирующих в морских организмах, ограничены. Роль их практически не изучалась. Бурые водоросли являются основным ингредиентом пищевого рациона морских организмов. Фукоиданы сульфатированные полисахариды бурых водорослей, в последние годы стали объектом повышенного внимания и интенсивного исследования. Практический интерес к этим полисахаридам объясняется их низкой токсичностью и проявляемой ими разнообразной биологической активностью. Стоит принять во внимание структурное разнообразие фукоиданов, что предполагает наличие в природе большого числа ферментов, катализирующих гидролиз фукоиданов, И ИХ ингибиторов, имеющих специфичность. Однако, сообщения о продуцентах фукоиданаз единичны. В нашей лаборатории была выделена высокоочищенная рекомбинантная фукоиданаза FFA 2 из морской бактерии Formosa algae KMM 3553^T.

Цель данного исследования — поиск среди метаболитов бурых водорослей, произрастающих в морях Дальнего Востока России, эффекторов фукоидан гидролаз. Ингибиторы рекомбинантной фукоиданазы FFA 2 были обнаружены и выделены из водноэтанольных экстрактов бурых водорослей *Fucus evanescens* и *Costaria costata*. Ингибиторы относятся к флоротаннинам — полифенолам бурых водорослей. Мономерной единицей флоротаннинов является флороглюцинол (1,3,5-тригидроксибензол). Основываясь на типе связи мономеров, флоротаннины можно разделить на четыре класса: фугалолы и флоретолы (эфирная связь), фукофлоретолы (эфирные и фенильные связи) и эколы и кармалолы (дибензодиоксиновая связь).

Методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии было установлено, что из F. evanescens был выделен ингибитор фукоиданазы FFA 2 (IFe) фукофлоретол (степень полимеризации — три мономерных единицы). Из C. costata был выделен ингибитор фукоиданазы FFA 2 (ICc) высокомолекулярный флоретол (степень полимеризации — 12-25 мономерных единиц). IC_{50} для ICc и IFe составила 39 мг/мл и 22 мг/мл соответственно. IC_{50} ингибиторов была рассчитана как концентрация, при которой активность действия фермента FFA 2 снижалась на 50%. Для обоих ингибиторов установлен необратимый тип ингибирования. Было определено, что для ингибирования 1 молекулы фукоиданазы FFA 2 необходимо две молекулы ингибитора ICc или семь молекул ингибитора IFe. Доступный коммерческий флоротаннин- флороглюцинол не ингибировал действие фукоиданазы FFA 2. Мы предположили, что эффективность ингибирования возрастает c увеличением молекулярной массы флоротаннинов, хотя не исключаем и влияние особенностей структуры ингибиторы ферментов морских животных и микроорганизмов, разрушающих ее целостность.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ 18-04-00905.

Морская геномика – новые возможности поиска путей биосинтеза вторичных метаболитов

М.П. Исаева¹, Н.Ю. Чернышева¹, В.И. Еремеев², А.П. Калиновский², В.В. Куриленко¹

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: issaeva@piboc.dvo.ru

Морские экосистемы - одни из самых богатых по неисследованным объектам животного мира системы, характеризующиеся микробным разнообразием и потенциалом открытия новых разнообразных ценных метаболитов. Новые технологии высокопроизводительного секвенирования геномов морских бактерий позволяют находить похожие гены уже описанных путей биосинтеза ценных метаболитов и делать предположение о наличии биосинтетического пути и структуре синтезируемой молекулы. Слизь ловчей сети морской полихеты Chaetopterus variopedatus (тип Annelida) является уникальной средой обитания микроорганизмов с экологически выстроенными с организмом-хозяином связями, увеличивающими шанс открытия новых и редких видов и метаболитов. Ранее из этой слизи были изолированы морские бактерии рода Vibrio, среди которых Vibrio sp. CB1-14 был определен как продуцент 6-эпи-монанхорина [1].

Мы выполнили секвенирование и аннотирование генома Vibrio sp. CB1-14. Поиск генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов, был проведен на сервере antiSMASH [2]. В геноме Vibrio sp. CB1-14 были обнаружены генные кластеры, ответственные за синтез сахаров и жирных кислот. Большинство кластеров было определено как гипотетические. К кластерам, ответственным за синтез антимикробных пептидов, был отнесен кластер №94. Из 28 генов этого кластера восемь связаны с синтезом дапдиамида – трипептидного антибиотика, формируемого необычными амидными лигазами [3]. Анализ последовательностей генов обнаружил высоко похожие генные кластеры только у Vibrio caribbeanicus ATCC BAA-2122 (менее 90% идентичности) и Vibrio sp. MEBiC08052 (менее 80%), а также некоторых Pantoea, Serratia и Pseudomonas. Особенностями дапдиамидного оперона у вибрионов являются объединение генов ddaF и ddaG, и разделение ddaD на ddaD1 и ddaD2. Проведенный Blast-анализ показал, что дапдиамидный кластер крайне редко встречается в бактериальных геномах. Мы провели ПЦР скрининг генов данного кластера в коллекции вибрионов, выделенных из слизи ловчей сети С. variopedatus, используя праймеры на ddaH и ddaI. В результате дапдиамидные гены были обнаружены только у четырех из 15 вибрионов коллекции: по данным дерева 16SrRNA, штаммы CB1-14, CB2-10 и CB2-8 группируются вместе и могут быть новым видом, в то время как штамм CB1-7 относится к виду V. barjaei.

Дальнейшая работа по изучению генного кластера должна быть сосредоточена на установлении структуры и биоактивности синтезируемой им молекулы, что будет способствовать усилению предсказательной способности геномного подхода в открытии природных веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 17-14-01065.

- 1. Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., et al. // Mar. Drugs. 2019. V. 17, N 4. P. 213.
- 2. Blin K. et al. // NAR. 2017. W36-W41.
- 3. Dawlaty J. et al. // J. Nat. Prod. 2010. V. 73. N 3. P. 441–446.

Сравнительный in silico анализ комплексов APETx-подобных пептидов актинии Heteractis crispa с протончувствительными ионными каналами

Р.С. Калина, И.Н. Гладких, М.М. Монастырная, Э.П. Козловская, Е.А. Зелепуга Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: kalinarimma@gmail.com

Актинии — древнейшие ядовитые животные, продуцирующие сотни биологически активных белков и пептидов, в том числе модуляторы протончувствительных ионных каналов ASICs (Acid Sensing Ion Channels). Пептиды актинии *Heteractis crispa*, Hcr 1b-2 — Hcr 1b-4, являются единственными модуляторами ASICs, способными практически в равной степени влиять на пропускание тока как через ASIC1a, так и ASIC3 каналы [1, 2]. Проведенный нами ранее анализ гомологичных моделей пептидов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-4 [3] показал, что для взаимодействия с ASIC каналами они, вероятно, используют аминокислотные остатки, отличные от функционально важных остатков их ближайшего гомолога, пептида APETx2 (идентичность 46 и 49 % соответственно), ингибирующего ASIC3 каналы [4].

Для проверки этого предположения, методом молекулярного докинга были получены теоретические модели комплексов токсинов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-4 с каналами крысы, rASIC1a и rASIC3, которые были использованы нами ранее для тестирования способности этих пептидов влиять на активность ASIC каналов [1]. Прототипом для создания гомологичных моделей 3D-структур каналов крысы послужила структура канала курицы, cASIC1a (идентичность 90 и 52% соответственно) в состоянии релаксации (Protein Data Bank ID: 6AVE и 5WKV) [5].

Анализ архитектуры генерированных моделей комплексов показал, что предполагаемые сайты связывания пептидов Hcr 1b-2 и Hcr 1b-4 с rASIC1a и rASIC3 каналами локализованы в области «кислотного кармана» и включают спираль α 5 домена «thumb», несколько отрицательно заряженных остатков домена «finger» в глубине кармана, а также остатки β -тяжей домена «palm» соседней субъединицы. Они частично перекрывают друг друга и сайты связывания токсинов PcTx1, Ma-1 и MitTx α/β – модуляторов ASIC1a [2], но не предполагаемый сайт связывания APETx2, который, согласно данным T. Rahman и E.J. Smith, включает верхнюю часть домена «thumb» ASIC3 канала [6].

В то же время, согласно результатам моделирования, интерфейсы Hcr 1b-2 и Hcr 1b-4 в составе их комплексов как с rASIC1a, так и с rASIC3 каналами, сформированы практически эквивалентными остатками пептидов. Однако, несмотря на высокую гомологию аминокислотных последовательностей с APETx2, аминокислотные остатки пептидов Hcr 1b-2 или Hcr 1b-4, вовлеченные во взаимодействие с rASIC3 каналом, как мы и предполагали, не совпадают с остатками молекулы APETx2, необходимыми для ингибирования ASIC3 [4]. Тем не менее, аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии этих трех пептидов с ASIC каналами, формируют уникальные основные/гидрофобные кластеры, подобные диадам основных и ароматических остатков токсинов PcTx1, Ma-1 и α-DTx, принадлежащих различным структурным классам [2]. Следует отметить, что величины дипольных моментов пептидных модуляторов ASICs существенно различаются, однако их направление коррелирует с ориентацией пептидов в комплексе с каналом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-38-00387.

- 1. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. // Peptides. 2018. V. 104. P. 41–49.
 - 2. Cristofori-Armstrong B., Rash L.D. // Neuropharmacology. 2017. V. 127. P. 173–184.
- 3. Kalina R.S., Gladkikh I.N., Dmitrenok P.S., Koshelev S.G., Zelepuga E.A., Kozlov S.A., Kozlovskaya E.P., Monastyrnaya M.M. // Vestnik FEB RAS. 2018. N 6. P. 41–43.
- 4. Jensen J.E., Cristofori-Armstrong B., Anangi R., Rosengren K.J., Lau C.H.Y., Mobli M., Brust A., Alewood P.F., King G.F., Rash L.D. // J. Med. Chem. 2014. V. 57. P. 9195–9203.
 - 5. Yoder N., Yoshioka C., Gouaux E. // Nature. 2018. V. 555. N 7696. P. 397–401.
 - 6. Rahman T., Smith E.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 450. N 1. P. 384–389.

Углеводсодержащие биополимеры морской грамотрицательной бактерии $Marinicella\ litoralis\ KMM\ 3900^{\mathrm{T}}$

 $\underline{\text{М.С. Kокоулин}}^1$, И.Н. Лизанов 2 , Л.А. Романенко 1 , Е.В. Соколова 1

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: maxchem@mail.ru

Микробные ценозы океана, как древнейшие на земле, включают особые, иногда лишь им присущие таксоны микроорганизмов, которые формировались на протяжении длительного периода эволюции. Морские микроорганизмы, находясь весьма специфических условиях обитания, отличаются ОТ наземных форм рядом приспособительных особенностей. Прежде всего, это относится к клеточной стенке бактерий, которая играет определяющую роль во взаимодействии микроорганизма с окружающей средой.

Штамм Marinicella litoralis KMM 3900^T был изолирован из образца воды, собранной в прибрежной зоне Японского моря. Липополисахарид (ЛПС) был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом. Дальнейшее исследование показало, что микроорганизм M. litoralis KMM 3900^{T} продуцирует два ЛПС с различными структурными характеристиками. Деградацию ЛПС проводили мягким кислотным гидролизом с последующей экстракцией липидной компоненты гель- и анионообменной хроматографией водорастворимой части. В результате были выделены специфических полисахарида (ОПС-1 и ОПС-2) и липид А (ЛА). На основании данных химического анализа и спектроскопии ЯМР, были установлены полные структуры ОПС. Показано, что ОПС-1 построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из остатков L-рамнозы, замещенной в положение О-2 остатком глицерофосфата, и D-маннозы (D-Man), несущей в положение О-6 остаток метилфосфата. ОПС-2 представляет собой гомополимер, состоящий из остатков 3-О-метил-D-маннозы, сульфатированных по положению О-4 и ацетилированных по положению О-6. Полисахарид, близкий по структуре с ОПС-1, ранее был выделен из морской бактерии Pseudoalteromonas agarivorans КММ 232 (S-форма). Он построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, а главным его отличием является отсутствие фосфатных групп и присутствие сульфатной группы в положение O-2 остатка L-Rha. Важно отметить, что остаток метилфосфата, найденный в ОПС-1, ранее среди бактериальных углеводсодержащих полимеров обнаружен не был. Метилированный по положению О-3 маннан ранее был выделен из микроорганизма Oligotropha carboxidovorans OM5, изолированного из сточных вод. Его главным отличием является отсутствие сульфатных групп.

Исследование ЛА методом масс-спектрометрии показало, что он представляет собой гетерогенную смесь изоформ двух структурно отличных типов молекул. Первый ЛА представлен дифосфорилированной диаминогенциобиозой, ацилированной жирными кислотами 11:0(3-O-11:0) и 11:0(3-OH)[3-O-11:0] в положения 2, 2' и 3 соответственно. Отличием второго ЛА является присутствие остатка D-Man, присоединяющегося через фосфодиэфирную связь к диаминогенциобиозе в положение 4', отсутствие вторичной 11:0 кислоты в положении 2 и замена вторичной 11:0 кислоты в положении 2' на C:7 кислоту.

Исследование биологической активности ЛПС по его способности индуцировать синтез медиаторов воспалительного процесса в клетках цельной крови человека показало, что он является слабым индуктором синтеза ΦHO - α и ИЛ-6, а также проявляет антагонистические свойства по отношению к ЛПС *Escherichia coli*.

Сравнительный структурный анализ сульфатированных полисахаридов водорослей семейства Phyllophoraceae

А.О. Кравченко 1 , С.Д. Анастюк 1 , В.П. Глазунов 1 , В.В. Исаков 1 , В.А. Нагибко 2 , И.М. Ермак 1

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: kravchenko 25.89@mail.ru

Каррагинан и агар – полисахариды красных водорослей, полимерная цепь которых построена из чередующихся остатков 1,3-связанной β-D-галактозы и 1,4-связанной αгалактозы, принадлежащей к D-ряду в случае каррагинана и к L-ряду в случае агара. Остаток 1.4-связанной α -галактозы может частично или полностью находиться в форме 3.6ангидропроизводного, гидроксильные группы могут быть сульфатированы, метилированы или замещены остатками D-ксилозы, глюкуроновой и пировиноградной кислот, что обуславливает большое структурное разнообразие данных полисахаридов. Вследствие особенностей биосинтеза полимерная цепь полисахаридов красных водорослей, как правило, содержит повторяющиеся дисахаридные звенья нескольких типов каррагинанов или же звенья каррагинана и агара, формируя так называемые гибридные структуры. Каррагинан и агар способны повышать вязкость водных растворов и образовывать гели, а также обладают разнообразной биологической активностью. Физико-химические и биологические свойства этих полимеров находятся в тесной взаимосвязи с их структурой, которая в свою очередь зависит как от экзогенных факторов, определяемых условиями произрастания водоросли, так и эндогенных, связанных с физиологией макрофита, в частности его видовой принадлежностью и стадией развития.

На данный момент водоросли семейства Phyllophoraceae слабо изучены, в связи с чем целью работы является сравнительное исследование структуры полисахаридов (ПС), выделенных из двух представителей этого семейства (стерильная форма) Ahnfeltiopsis flabelliformis(Af) и Mastocarpus pacificus (Мр), широко распространенных на тихоокеанском российском побережье.

Согласно химическому анализу, основными моносахаридами выделенных водной экстракцией полисахаридов (выход 32%), являются 3,6-ангидрогалактоза и галактоза, молярное соотношение которых (1:2,1 для Af и 1,0:1,4 для Mp) указывает на большую нерегулярность ПС из водоросли *А. flabelliformis*. ПС Мрхарактеризуется большей степенью сульфатирования и высокой молекулярной массой (700 кДа), превосходящей молекулярную массу ПС Af более чем в 8 раз.

Фракционирование ПС Af специфическими для каррагинанов солями калия и кальция различных концентраций приводит к его разделению на желирующие и нежелирующие фракции, тогда как в случае ПС Мр подобного разделения не происходит.

Согласно частичному восстановительному гидролизу, полисахариды обеих водорослей содержат только дисахаридные звенья каррабиозы.

Согласно результатам, полученным методами ИК, ЯМР спектроскопии и массспектрометрии, полисахарид из стерильной формы водоросли *М. pacificus* представляет собой каррагинан с гибридной каппа/йота структурой, в которой преобладают звенья каппа-типа. Полимерная цепь данного каррагинана построена из каппа-каррабиозы, йотакаррабиозы, каппа-карратетраозы, а также гибридных каппа/йота олигосахаридов и минорных количеств предшественников каппа- и йота-каррагинанов.

В отличие от *M. pacificus* желирующий полисахарид из стерильной формы *A. flabelliformis* имеет гибридную каппа/бета структуру с соотношением каппа- и бета-звеньев 3:1 и содержит минорные количества йота- и гамма-каррагинанов. Полимерная цепь этого полисахарида построена изкаппа-каррабиозы, каппа-карратетраозы, бета-каррабиозы, бета-карратетраозы, тетра- и гекса-олигосахаридов с различной последовательностью чередования каппа- и бета-звеньев.

Пептиды Кунитц-типа актиний: разнообразие и фармакологический потенциал

<u>Е.В. Лейченко</u>, А.Н. Кветкина, И.Н. Гладких, О.В. Синцова, В.Е. Чаусова, Е.А. Зелепуга, М.М. Монастырная, М.П. Исаева, Э.П. Козловская

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: leychenko@gmail.com

В настоящее время для лечения и предупреждения таких заболеваний как болезни Альцгеймера, Паркинсона, артрит, панкреатит, рак и многих других широко используют соединения, способные подавлять активность протеаз и/или медиаторов воспаления. Ингибиторы протеаз Кунитц-типа, обнаруженные как у беспозвоночных, так и у млекопитающих, представляют особый интерес вследствие широкой распространенности, структурного разнообразия и мультитаргетности.

Актинии, ядовитые кишечнополостные животные, продуцируют большой репертуар биологически активных пептидов, включая ингибиторы протеаз Кунитц-типа. Установлено, что эти пептиды кодируются мультигенными семействами и образуют природные комбинаторные библиотеки [1]. Недавно нами было найдено новое уникальное подсемейство IQ-пептидов. Отличительной особенностью их предшественников является наличие короткого пропептида, который оканчивается сайтом Lys-Arg, характерным для нейро- и цитотоксинов, но отсутствующим в предшественниках пептидов других подсемейств Кунитц-типа актиний *Heteractis crispa* и *H. magnifica*, что может указывать на рекрутирование этих пептидов в яд в ходе эволюционных событий.

Актуальной задачей является выяснение молекулярных мишеней и механизма действия потенциальных лекарственных препаратов. Установлено, что все исследуемые нами пептиды Кунитц-типа ингибируют трипсин и химотрипсин, некоторые взаимодействуют с протеазами воспаления и/или протеазами каскада коагуляции [2]. Кроме того, нами обнаружены пептиды, способные блокировать потенциал-зависимые калиевые каналы, а также взаимодействовать с TRPV1 и TRPA1 рецепторами [3]. Показано, что пептиды ингибируют действие гистамина на макрофаги костного мозга мыши, снижают уровень активных форм кислорода, оксида азота II и цитокинов (проИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-а), продуцируемых в макрофагах при добавлении бактериального ЛПС [4-6]. Кроме того, некоторые пептиды повышают жизнеспособность клеток нейробластомы Neuro2a в присутствии β-амилоида (модель болезни Альцгеймера) [7] и в модели 6-ОНDА-индуцированной нейротоксичности (модель болезни Паркинсона).

- 1. Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. // Peptides. 2012. V. 34. P. 88–97.
- 2. Кветкина А.Н., Калужский Л.А., Лейченко Е.В., Исаева М.П., Иванов А.С., Козловская Э.П. // ДАН. 2019. Т. 487. № 2. С. 108–111.
- 3. Monastyrnaya M.M., Peigneur S., Zelepuga E.A., Sintsova O.V., Gladkikh I.N., Leychenko E.V., Isaeva M.P., Tytgat J., Kozlovskaya E.P. // Mar. Drugs. 2016. V. 14. N. 12. P. 2–20.
- 4. Синцова О.В., Монастырная М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. // Биоорган. химия. 2015. Т. 41. С. 657–663.
- 5. Синцова О.В., Пислягин Е.А., Гладких И.Н. Монастырная М.М., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П.// Биоорган. химия. 2017. Т. 43. №. 1. С. 105–112.
- 6. Gladkikh I.N., Monastyrnaya M.M., Leychenko E.V., Zelepuga E.A., Chausova V.E., Isaeva M.P., Anastyuk S.D., Andreev Y.A., Peigneur S., Tytgat J., Kozlovkaya E.P. // Mar. Drugs. 2012. V. 10. P. 1545–1565.
- 7. Кветкина А.Н., Лейченко Е.В., Юрченко Е.А., Пислягин Е.А., Пеньёр С., Титгат Я., Исаева М.П., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. // Биоорган. химия. 2018. Т. 44. № 4. С. 408–416.

Радиосенсибилизирующее действие полисахаридов бурой водоросли Fucus evanescens

О.С. Маляренко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: malyarenko.os@gmail.com

Рак является одной из важнейших проблем здравоохранения в мире. Лучевая терапия — один из основных методов лечения рака, который подразумевает использование радиации для уменьшения размеров опухоли или для полного ее разрушения [1]. Несмотря на успехи, достигнутые в лечении злокачественных новообразований с помощью лучевой терапии, проблема формирования радиорезистентности опухолей продолжает оставаться одной из важнейших для онкологии. Известно, что индукция первичных изменений, вызывающих резистентность опухолей к повреждающим воздействиям, происходит как на молекулярном, так и на клеточном уровне: взаимодействие с мишенями, блокирование отдельных внутриклеточных процессов, нарушение контроля клеточного цикла и апоптоза [2].

В связи с вышесказанным разработка способов повышения чувствительности опухолевых клеток к радиоизлучению с помощью препаратов, способных контролировать активацию/супрессию внутриклеточных сигнальных каскадов, продолжает оставаться актуальной задачей в терапии рака любой локализации.

Водорастворимые полисахариды бурых водорослей (ламинараны и фукоиданы) обладают такими уникальными свойствами, как модуляция функциональных онкобелков и белков-супрессоров, регуляция путей клеточной сигнальной трансдукции, контроль неопластической трансформации клеток и др. [3]. Их низкая токсичность для организма, экологически чистые и экономичные технологии производства делают ламинараны и фукоиданы перспективной основой для разработки препаратов для лечения особо опасных заболеваний.

Цель данного исследования — изучение радиосенсибилизирующего действия ламинарана и фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и установление молекулярного механизма действия полисахаридов.

В результате проделанной работы определено, что ламинараны и фукоиданы проявляют значительную противораковую активность по отношению к клеткам меланомы, рака кишечника и молочной железы человека. Показано, что фукоидан эффективно повышает чувствительность опухолевых клеток к радиоактивному излучению, а ламинаран защищает здоровые клетки организма от излучения. Установлено, что фукоидан усиливает апоптоз, индуцированный радиацией, посредством активации инициаторных и эффекторных каспаз, подавления экспрессии антиапоптотического белка и усиления фрагментации ДНК.

Полученные данные подтверждают перспективность использования полисахаридов бурых водорослей в качестве радиопротекторов и радиосенсибилизаторов при лечении онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-20013.

- 1. Arruebo M., Vilaboa N., Sáez-Gutierrez B., Lambea J., Tres A., Valladares M., González-Fernández Á. // Cancers (Basel). 2011. V. 3. P. 3279–3330.
- 2. Kim B.M., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y.H., Lee T.H., Chang K.T., Hong Y. # Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 11. P. 26880–26913.
 - 3. Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 183. P. 91–101.

Биологическая активность лектинов из двустворчатого моллюска Glycymeris yessoensis

 $\frac{\text{Т.О. Мизгина}}{^{l}}^{1,2}$, И.В. Чикаловец 1,2 , В.И. Молчанова 2 , О.В. Черников 2 l Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 2 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: tanya.tasha@mail.ru

Лектины — это обширный класс белков, обладающих общим свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их ковалентной структуры. Через углевод-белковое узнавание осуществляются важные биологические процессы, и благодаря способности распознавать углеводные структуры на поверхности клеток, лектины нашли широкое применение в биологии и медицине. Лектины морских беспозвоночных — это удобная экспериментальная модель для изучения эволюционных аспектов становления и функционирования системы неспецифического, или врожденного иммунитета. В настоящее время постоянно идет поиск новых источников лектинов из морских беспозвоночных.

Объектом исследования был выбран двустворчатый моллюск *Glycymeris yessoensis*— широко распространенный тихоокеанский вид двустворчатых моллюсков, имеющий промысловые скопления, являющийся перспективным объектом для добычи.

Проведенный скрининг экстрактов из органов моллюска показал, что максимальное количество лектина содержится в гемолимфе моллюска. Последовательными методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации (FPLC) были выделены несколько лектинов: GYL (металл-независимый лектин, с молекулярной массой по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии 18118,5 Да), проявляющий активность к гликопротеинам муцинового типа, и GYLman (Ca^{2+} -зависимый высокомолекулярный лектин), обладающий аффинностью к высокоразветвленным гомополисахаридам — маннанам, построенным из α -1,2 и α -1,6-связанных остатков D-маннозы.

Как известно, лектины играют важную роль в реакциях конститутивного или врожденного иммунитета. Являясь составной частью иммунитета беспозвоночных, лектины осуществляют немедленную, в отличие от системы адаптивного иммунитета, реакцию на инфекцию или повреждение. Для определения функций лектинов в организме моллюска, было исследовано взаимодействие GYL и GYLman с микроорганизмами, патогенными для двустворчатых моллюсков.

Исследование изменения уровня GYL в ответ на внешнее вторжение чужеродных агентов показало, что концентрация этого лектина увеличивается сразу же после введения дрожжей Pichiapastoris и бактерий Vibrio proteolyticus, но по мере удаления патогенов из организма моллюска, уровень лектина возвращается к исходному значению. Это позволяет предположить, что исследуемые лектины являются компонентами иммунной системы моллюска и участвуют в защите организма беспозвоночного от воздействия чужеродных агентов. При изучении отомкап взаимодействия GYLman патогенными микроорганизмами специфично было показано, что лектин грамположительные (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis), так и грамотрицательные (Escherichia coli, Vibrio proteolyticus) бактерии, а также дрожжи Pichiapastoris.

Полученные данные позволяют рассматривать GYLman и GYL, как факторы иммунной системы моллюска, участвующие в защите организма беспозвоночного от воздействия чужеродных агентов. Исследование системы неспецифического иммунитета беспозвоночных, в частности, имеет большое значение для понимания процесса формирования и становления функций этого компонента защитной системы в эволюции беспозвоночных.

Пептидные токсины морских актиний как фармакологические инструменты

М.М. Монастырная, Е.В. Лейченко, И.Н. Гладких, О.В. Синцова, Р.С. Калина, А.Н. Кветкина, Е.А. Зелепуга, Э.П. Козловская

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: rita1950@gmail.com

Токсины, продуцируемые ядовитыми организмами для нападения и защиты от естественных врагов, уже давно получили признание в практической медицине как фармакологические агенты, способные оказывать влияние на важнейшие физиологические процессы организма благодаря специфическому взаимодействию с биологическими мишенями. Лиганды белковой природы с установленной структурой и механизмом действия используют в различных областях наук о жизни в качестве инструмента исследования молекулярной организации и механизмов функционирования мишеней. Они являются также незаменимым фармакологическим инструментом для подтверждения участия тех или иных типов и субтипов ионных каналов как ключевых молекулярных участвующих в различных патологических процессах, мишеней, коррекцию и терапевтическое действие на которые способны оказывать лиганды. Интенсивные поиски селективных пептидных лигандов в ядовитых секретах различных организмов позволили установить наличие широкого функционального и структурного разнообразия, что привело к созданию ряда современных лекарственных препаратов, специфично взаимодействующих с определенными мишенями [1]. В данном сообщении обобщены результаты исследований, проводившихся в Лаборатории химии пептидов в последние годы, которые были направлены на поиск в ядах морских актиний новых белковых токсинов, идентификацию их биологических мишеней и установление фармакологического потенциала.

В ядовитом секрете актиний Heteractis crispa и Heteractis magnifica обнаружены пептидные токсины нескольких структурных типов, в том числе два новых представителя нейротоксинов II структурного типа, δ-SHTX-Hcr1f и RTX-VI (5 кДа) [2,3], и четыре АРЕТх-подобных пептида, Hcr 1b-1-4 (4,5 кДа), с фолдом, подобным пептидам семейства β-дифензиновов [4,5], а также 47 представителей мультигенного семейства αпороформирующих токсинов (α -ПФТ) с β -сендвич+ α -спираль фолдом (\sim 20 кДа) [6]. мишенью которых являются содержащие сфингомиелин цитоплазматические мембраны. Структурно-функциональные, электрофизиологические и *in silico* исследования показали, что нейротоксины модифицируют потенциалзависимые натриевые каналы (субтипы Na_V1.1, 1.2, 1.3 и 1.6), в то время как APETх-подобные пептиды – кислоточувствительные ASIC3 and ASIC1 асубтипы [4,5]. Обнаружено, что пептиды Hcr 1b-2, -3, -4 обладают *in vivo* анальгетической активностью. *In vitro* исследование α-ПФТ показало, что при низких и концентрациях тонклакодп противоопухолевую нецитотоксических они канцерпревентивную активность [7]. Установлено также наличие у актиний мультигенных семейств ингибиторов сериновых протеиназ (6 кДа) с фолдом Кунитца (более 60 представителей) [8]; два из них, нативные пептиды HCRG1 и HCRG2, блокируют потенциалзависимые калиевые каналы млекопитающих (субтипы K_v1.1, 1.2, 1.3, 1.6) и насекомых (ShakerIR) и обладают *in vivo* и *in vitro* противовоспалительной активностью [9]. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что актинии представляют собой один из наиболее перспективных морских источников пептидных токсинов с выраженным фармакологическим потенциалом.

- 1. Peigneur S., Tytgat J.// Toxins. 2018. V. 10. P. 1-4.
- 2. Kalina R., Gladkikh I., Peigneur S., Dmitrenok P., Zelepuga E. et al. //Toxicon. 2019. V. 159. S1-S32.
- 3. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M. et al. // J. Proteomics. 2018. V. 173. P. 12–21.
- 4. Козлов С.А., Осмаков Д.И., Андреев Я.А. и др. // Биоорган. химия. 2012. Т. 38. С. 653-659.
- 5. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S. et al. // Peptides. 2018. V. 104. P. 41–49.
- 6. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 183.
- 7. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L. et al. // Toxicon. 2010. V. 55. P. 811–817.
- 8. Isaeva M., Chausova E., Zelepuga E., Guzev K., Tabakmakher V. et al. // Peptides. 2012. V. 34. P. 88-97.
- 9. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., Sintsova O. et al. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 6038–6063.

Структура фукоидана из Sargassum horneri и его производных

А.Б. Расин, А.С. Сильченко, М.И. Кусайкин, А.И. Калиновский, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток Электронная почта abrus_54@mail.ru

Фукоиданы – сульфатированные полисахариды, построенные главным образом из остатков фукозы, имеют сложную структуру. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей рода *Sargassum*, отличаются гетерогенностью по моносахаридному составу, что осложняет установление их тонкой структуры. Достижению этой цели может существенно помочь применение мягких ферментативных методов для деполимеризации фукоидана [1]. Ранее после действия рекомбинантной фукоиданазы на фукоидан из *Sargassum horneri* нами был получен ряд сульфатированных олигосахаридов (фракция LMP),структура которых была установлена при помощи спектроскопии ЯМР [2]. Это позволило определить строение нескольких участков молекулы фукоидана, однако структура большей части оставалась неизвестной.

В данной работе нами была исследована структура высокомолекулярных фрагментов (НМР) фукоидана из *Sargassum horneri*, полученных после расщепления его фукоиданазой. Их содержание в фукоидане составляло 52%. После дальнейшего разделения с помощью анионобменной хроматографии было выделено три фракции. Анализ моносахаридного состава полученных фракций показал, что две фракции состояли только из остатков фукозы, а третья также содержала небольшое количество галактозы.

Анализ спектров ЯМР данных фракций показал наличие следующих элементов: повторяющиеся $1 \rightarrow 3$ - и $1 \rightarrow 4$ -связанные 2- и 2,3-сульфатированные фрагменты α -L-фукопиранозы в основной цепи и несульфатированные $1 \rightarrow 2$ -связанные дисахаридные боковые цепи. В первой фракции они примыкали к свободному С4 основной цепи. Это согласуется с данными, полученными при исследовании фракции LMP и позволяет сделать вывод, что структура фукоидана из *S. horneri* представляет собой разветвлённый полисахарид, основная цепь которого состоит преимущественно из повторяющихся фрагментов со структурой $\rightarrow 3$ - α -L-Fuc $p(2SO_3^-)$ - $1 \rightarrow 4$ - α -L-Fuc $p(2,3SO_3^-)$ - $1 \rightarrow$. Свободная ОНгруппа при С4 может быть замещена боковой цепью со структурой α -L-Fucp- $1 \rightarrow 2$ - α -L-Fucq- $1 \rightarrow 2$ - $1 \rightarrow 2$ - $1 \rightarrow 2$ - $1 \rightarrow 2$ - $2 \rightarrow 2$ - $2 \rightarrow 2$ - $2 \rightarrow 3$ - $3 \rightarrow 4$ - $4 \rightarrow 4$ -

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-20013.

^{1.} Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N. // Glycobiology. V.26. N 1. P. 3–12.
2. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Kalinovsky A.I., Miansong Z., Changheng L. // Carbohydr. Polym. V. 175. P. 654–660.

Фукоиданазы и фукоидансульфатазы из морских бактерий

А.С. Сильченко, А.О. Зуева, А.Б. Расин, М.И. Кусайкин, Т.Н. Звягинцева, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: artem.silchencko@yandex.ru

Анионные полисахариды морских водорослей являются адаптивными соединениями, обеспечивающими выживание водорослей в морской среде благодаря их физико-химическим свойствам [1,2]. Фукоиданы являются представителями класса сульфатированных полисахаридов, встречающихся в бурых водорослях. Основным строительным блоком этих биополимеров являются сульфатированные остатки L-фукозы [3]. В простейших случаях остатки L-фукозы образуют полимерную цепь посредством а- $(1 \rightarrow 3)$ -, либо чередующихся α - $(1 \rightarrow 3)$ - и α - $(1 \rightarrow 4)$ -гликозидных связей. Свободные гидроксильные группы в остатках L-фукозы могут быть замещены сульфатными группами, ацетатными группами, остатками фукозы или другими моносахаридами в качестве ответвлений. Помимо фукозы основная цепь фукоиданов может содержать существенное количество других моносахаридных остатков, таких как галактоза, ксилоза, рамноза, глюкуроновая кислота и др. [3]. Эти полисахариды обладают широким спектром биологических активностей [3], однако определение взаимосвязи между структурой и их биологическим действием затруднено из-за сложного строения этих макромолекул. Ферменты морских организмов, участвующие в катаболизме фукоиданов, являются инструментами установления перспективными ДЛЯ детальной полисахаридов. Однако эти ферменты мало изучены.

Целью работы являлось изучение разнообразия субстратных специфичностей двух групп ферментов: фукоиданаз и фукоидан сульфатаз морских бактерий. Эти ферменты принадлежат к классу гидролаз и катализируют гидролитическую деполимеризацию и десульфатирование фукоиданов в процессе его катаболизма морскими организмами.

Объектами исследования были пять фукоиданаз морских бактерий *Alteromonas* sp. SN-1009 (Fda1), *Formosa algae* KMM 3553 (FFA1 и FFA2), *Wenyingzhuangia fucanilytica* CZ1127 (FWf1 и FWf2) и две фукоидан сульфатазы морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127 (SWF1 и SWF4). Использование разнообразных фукоиданов и сульфатированных фукоолигосахаридов позволило установить детальную субстратную специфичность и каталитические особенности исследуемых ферментов [4-7]. Полученные результаты дают новые знания о процессе катаболизма фукоиданов морскими бактериями и открывают новые возможности в изучении детальных структур этих полисахаридов с помощью ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00905 а.

- 1. Chi S., Liu T., Wang X., Wang R., Wang S., Wang G., Shan G., Liu C. // Curr. Genet. 2018. V. 64. P. 259–273.
- 2. Deniaud-Bouët E., Hardouin K., Potin P., Kloareg B., Hervé C. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 395–408.
 - 3. Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 2106–2130.
- 4. Cao H.T.T., Mikkelsen M.D., Lezyk M.J., Bui L.M., Tran V.T.T., Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Pham T.D., Truong B.H., Holck J., Meyer A.S. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. 422.
- 5. Silchenko A.S., Rasin A.B., Zueva A.O., Kusaykin M.I., Zvyagintseva T.N., Kalinovsky A.I., Kurilenko V.V., Ermakova S.P. // Biomolecules. 2018. V. 8, N 4. P. E98.
- 6. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R.V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N. // Glycobiology. 2017. V. 27. P. 254-263.
- 7. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Kalinovsky A.I., Miansong Z., Changheng L., Malyarenko O., Zueva A.O., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 1. P. 654–660.

Влияние каррагинанов на компоненты липидного обмена in vitro

<u>Е.В. Соколова</u>¹, Н.В. Сергеева², А.О. Кравченко¹, В.Н. Давыдова¹, Л.Н. Богданович², И.М. Ермак¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Медицинское объединение ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: eka9739@gmail.com

Каррагинаны – сульфатированные полисахариды красных водорослей, в основе химической структуры которых находится дисахаридное повторяющееся звено, состоящее из остатков D-галактозы, соединенных регулярно чередующимися β-1-4 и α-1-3 гликозидными связями. Эти полисахариды внесены в список пищевых компонентов при строгом соответствии определенным параметрам, регламентированным Международным комитетом, и широко используются в пищевой промышленности. Кроме того, каррагинаны обладают широким спектром биологических активностей, среди которых можно выделить их иммуномодулирующее действие. Известно, что липидные медиаторы желудочнокишечного тракта оказывают существенное воздействие на организм человека. Например, простагландин Е2 (РGE2), который вносит существенный вклад в иммунную регуляцию и поддержание желудочно-кишечного гомеостаза, включая секрецию муцина, желудочную цитопротекцию и кровоток слизистой оболочки [1]. Также было предположено, что способность пищевых волокон предотвращать повторное всасывание таких липидных компонентов желудочно-кишечного тракта, как желчные кислоты, в энтерогепатический цикл приводит к изменению динамики холестерина в организме [2]. Так, клинические исследования показали, что профилактическое применение каррагинанов в пищу, как дополнительного источника пищевых волокон, благотворно влияет на липидный обмен у практически здоровых людей и нормализует показатели липидного профиля у пациентов с ишемической болезнью сердца [3,4]. Подобные исследования для лечения дислипидемии также были выполнены на животных моделях [5].

Целью данного исследования было изучение влияния сульфатированных полисахаридов красных водорослей (к-, 1/к и к/β-каррагинанов) по отдельности и в сочетании с липополисахаридом (ЛПС) на синтез PGE2 и цитокинов (IL-1β и IL-6) в модели цельной крови in vitro. Результаты показали, что каррагинаны обладают значительной способностью модулировать синтез PGE2 и стимулировать синтез IL-1β и IL-6 в высоких концентрациях. Низкая степень сульфатирования является необходимым условием для способности каррагинанов модулировать синтез PGE2. Кроме того, была изучена способность каррагинанов индивидуально и в сочетании с казеином, как модель пищи, окружающей каррагинан в желудочно-кишечном тракте, влиять на проницаемость солей желчных кислот через искусственную мембрану, имитирующую желудочно-кишечный барьер (РАМРА исследование). Менее сульфатированный к/β-каррагинан был способен сохранять проникновение солей желчных кислот (2, 4 и 8 мМ) в наибольшей степени, но с меньшей эффективностью, чем холестирамин. Присутствие казеина в реакционной смеси ограничивало влияние каррагинана на соли желчных кислот. Была исследована активность липазы поджелудочной железы в присутствии исследуемых полисахаридов, и оказалось, что каррагинаны не влияют на активность этого фермента. Полученные данные подтверждают один из возможных механизмов снижения холестерина липопротеинов низкой плотности каррагинаном.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00454.

- 1. Shimizu T. // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2009. V. 49. P. 123-150.
- 2. Ferrebee C.B., Dawson P.A. // ActaPharm.Sin.B 2015. V. 5. P. 129-134.
- 3. Panlasigui L.N., Baello O.Q., Dimatangal J.M., et. al. // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2003. V. 12. P. 209-214.
- 4. Sokolova E.V., Bogdanovich L.N., Ivanova T.B., et. al. // Pharm. Nutrit. 2014. V. 2. P. 33-37.
- 5. Weiner M.L. // Crit. Rev. Toxicol. 2014. V. 44. P. 244-269.

Мультифункциональные нанокомпозиты на основе биополимеров с необычным комплексом востребованных оптических, магнитных, каталитических и биологически активных свойств

Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск Электронная почта: sukhov@irioch.irk.ru

Разработаны и развиваются методы получения водорастворимых биосовместимых гибридных неоргано-органических нанокомпозитов [1-5], представляющих собой инкапсулированные в макромолекулы биополимеров наночастицы нульвалентных металлов, халькогенов, металлохалькогенидов, других химических элементов и их соединений, а также органических веществ [6-20].

В докладе обсуждается получение, строение, физико-химические, биологические свойства новых нанобиокомпозитов и их перспективные области применения в качестве магнитных, оптических, каталитических материалов, а также средств параллельной многоканальной терапии и диагностики (тераностики) в биомедицине.

- 1. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Александрова Г.П. и др. // Докл. АН. 2003. Т. 393. № 5. С. 634-635.
- 2. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Медведева С.А. и др. // Физич. мезомех. 2004. Т. 7. № S1-2. С. 139-142.
- 3. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А. и др. // Журн. структ. хим. 2007. Т. 48. № 5. С. 979-984.
 - 4. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Носырева В.В. и др. // Докл. АН. 2007. Т. 417. № 1. С. 62-64.
 - 5. Мячина Г.Ф., Коржова С.А., Ермакова Т.Г. и др. // Докл. АН. 2007. Т. 427. № 6. С. 790-792.
 - 6. Мячина Г.Ф., Конькова Т.В., Коржова С.А. и др. // Докл. АН. 2010. Т. 431. № 1. С. 50-51.
- 7. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Богомяков А.С. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2010. № 12. С. 2261-2265.
 - 8. Александрова Г.П., Лесничая М.В., Мячин Ю.А. и др. // Докл. АН. 2010. Т. 439. $\ \mathfrak{N} \ 2$. С. 198-200.
- 9. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др. // Докл. АН. 2011. Т. 440. № 5. С. 639-642.
 - 10. Petrova M.V., Kiryutin A.S., Savelov A.A. идр. // Appl. Magnet. Reson. 2011. V.41. No 2-4. P. 525-536.
 - 11. Gasilova E.R., Aleksandrova G.P., Sukhov B.G. et al. // Macromol. Symp. 2012. V. 317-318. P. 1-6.
- 12. Gasilova E.R., Matveeva G.N., Aleksandrova G.P. et al. # J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. No 7. P. 2134-2141.
 - 13. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Долмаа Г. и др. // Докл. АН. 2014. Т. 456. № 1. С. 56-59.
- 14. Шурыгина И.А., Родионова Л.В., Шурыгин М.Г. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2015. Т. 79. № 2. С. 280-282
 - 15. Фадеева Т.В., Шурыгина И.А., Сухов Б.Г. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2015. Т. 79. № 2. С. 297-299.
 - 16. Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А. и др. // Докл. АН. 2015. Т. 461. № 2. С. 239-241.
- 17. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Sukhov B.G. // Antib. Resist.: Mechan. New Antimicrob. Appr. 2016. P. 167-186.
 - 18. Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P. et al. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 18-26.
- 19. Khutsishvili S.S., Lesnichaya M.V., Vakul'skaya T.I. et al. // Spectrosc. Lett. 2018. V. 51. No 4. P. 169-173.
 - 20. Lesnichaya M.V., Shendrik R., Sukhov B.G. // J. Lumin. 2019. V. 211. P. 305-313.

Новый взгляд на антимикробное наносеребро, другие наноструктурированные металлы и полупроводники: поражающие электрические факторы перманентно поляризующихся наночастиц

Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск Электронная почта: sukhov@irioch.irk.ru

Разработаны новые подходы к направленному синтезу нанокомпозитов с комплексом разнообразных биологических свойств [1-22]. Основная идея разработки антимикробных нанобиокомпозитов состоит в том, что наночастицы серебра и других металлов или полупроводников заключаются в макромолекулы биополимеров, которые в естественной природной среде являются первично метаболитными ("пищевыми") для микробов. В процессе непрестанного "пищевого" поиска происходит активный захват микробом биополимерных макромолекул (вместе с заключенными в них наночастицами) и последующая биоутилизация полисахарида. В результате наночастицы металлов или полупроводников эффективно доставляются и необратимо освобождаются на микробной клетке.

Будет обсуждаться перманентно флуктуирующее плазмон-поляритонное электрическое поле очень высокой напряженности, естественное для металлических и полупроводниковых наночастиц. Это электрополе наночастиц порождает эффекты дистанционной принудительной поляризации/деполяризации электрочувствительных мишеней микробных клеток, а также редокс-генерацию на электрических полюсах электродипольных наночастиц губительных для микробов свободных радикалов из молекул окружающей среды.

- 1. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Александрова Г.П. и др. // Докл. АН. 2003. Т. 393. № 5. С. 634-635.
- 2. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Медведева С.А. и др. // Физич. мезомех. 2004. Т. 7. № S1-2. С. 139-142.
- 3. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А. и др. // Журн. структ. хим. 2007. Т. 48. № 5. С. 979-984.
 - 4. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г., Носырева В.В. и др. // Докл. АН. 2007. Т. 417. № 1. С. 62-64.
 - 5. Мячина Г.Ф., Коржова С.А., Ермакова Т.Г. и др. // Докл. АН. 2007. Т. 427. № 6. С. 790-792.
 - 6. Мячина Г.Ф., Конькова Т.В., Коржова С.А. и др. // Докл. АН. 2010. Т. 431. № 1. С. 50-51.
- 7. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Богомяков А.С. и др. // Изв. АН. Сер. Хим. 2010. № 12. С. 2261-2265.
 - 8. Александрова Г.П., Лесничая М.В., Мячин Ю.А. и др. // Докл. АН. 2010. Т. 439. № 2. С. 198-200.
- 9. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др. // Изв. АН. Сер. Хим. 2010. № 12. С. 2266-2271.
- 10. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др. // Докл. АН. 2011. Т. 440. № 5. С. 639-642.
 - 11. Petrova M.V., Kiryutin A.S., Savelov A.A. идр. // Appl. Magnet. Reson. 2011. V.41. No 2-4. P. 525-536.
 - 12. Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V. et al. // Nanomed.: NBM. 2011. V. 7. No 6. P. 827-833.
 - 13. Gasilova E.R., Aleksandrova G.P., Sukhov B.G. et al. // Macromol. Symp. 2012. V. 317-318. P. 1-6.
- 14. Gasilova E.R., Matveeva G.N., Aleksandrova G.P. et al. $/\!/$ J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. No 7. P. 2134-2141.
 - 15. Лесничая М.В., Александрова Г.П., Долмаа Г. и др. // Докл. АН. 2014. Т. 456. № 1. С. 56-59.
- 16. Шурыгина И.А., Родионова Л.В., Шурыгин М.Г. и др. // Изв. РАН. Сер. Физ. 2015. Т. 79. № 2. С. 280-282.
 - 17. Фадеева Т.В., Шурыгина И.А., Сухов Б.Г. и др. // Изв. РАН. Сер. Физ. 2015. Т. 79. № 2. С. 297-299.
 - 18. Папкина А.В., Перфильева А.И., Живетьев М.А. и др. // Докл. АН. 2015. Т. 461. № 2. С. 239-241.
 - 19. Родионова Л.В., Шурыгина И.А., Сухов Б.Г. и др. // Журн. общ. хим. 2015. Т. 85. № 2. С. 314-316.
- 20. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Дмитриева Л.А. и др. // Изв. АН. Сер. Хим. 2015. № 7. С. 1629-1632.
- 21. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Sukhov B.G. // Antib. Resist.: Mechan. New Antimicrob. Appr. 2016. P. 167-186.
 - 22. Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P. et al. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 175. P. 18-26.

Бактериостатическая и цитотоксическая активности лектина из мидии Mytilus trossulus

А.П. Фильштейн, И.В. Чикаловец, В.И. Молчанова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: alishichka@mail.ru

Углевод-белковые взаимодействия играют важную роль в процессах межклеточного и молекулярно-клеточного узнавания. Такое связывание проявляется при контакте лигандов с рецепторами, антигенов с антителами, ферментов с субстратами. Лектины участвуют в углевод-белковом взаимодействии, связывая углеводы на поверхности клеток, вызывая перекрестную сшивку с последующей преципитацией – клеточной агглютинацией [1].

Морские организмы относятся к числу сравнительно новых источников лектинов. Особый интерес вызывают лектины морских беспозвоночных, так как они способны участвовать в многочисленных процессах в организме «хозяина», например, в таких реакциях как агглютинация, фагоцитоз, лизис и способны избирательно агглютинировать грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Ранее в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН был выделен и охарактеризован GalNAc/Gal – специфичный лектин из мидии Mytilus trossulus (МТL). Было показано, что МТL обладает фунгицидной и цитокин-стимулирующей активностями [2]. Лектины являются одними из главных компонентов, участвующих во врожденном иммунитете беспозвоночных, которые лишены приобретенного иммунитета. Система врождённого иммунитета неспецифична и не обладает «долгосрочной памятью», поскольку реагирует на некие молекулярные структуры, присущие всем патогенным микроорганизмам.

С целью определения антибактериальной активности лектина были проведены эксперименты по связыванию MTL с патогенными микроорганизмами (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Vibrio proteolyticus, Pichiapastoris), ингибированию им роста микроорганизмов и влиянию лектина на образования биопленок. В результате было установлено, что MTL связывается со всеми микроорганизмами, агглютинирует их, образуя агрегаты. Показано, что лектин ингибирует рост клеток P. pastoris, B. subtilis и E. coli на 46%, 20% и 79,2% соответственно и влияет на образование биопленок, уменьшая биомассу на 52,7% в случае с E. coli, на 13,0% -S. aureus, 9,6% -V. proteolyticus, 52,3% -B. subtilis.

Изучение цитотоксической активности показало, что в присутствии MTL гибнет 30% клеток протоковой карциномы молочной железы (T-47D) и лимфомы Беркета (DAUDI). Большую цитотоксичность лектин проявлял по отношению к аденокарциноме молочной железы (MCF-7), при концентрации лектина 100 мкг/мл наблюдалась гибель 56,2% клеток, IC_{50} достигалась при концентрации лектина 40,7 мкг/мл.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что MTL проявляет антибактериальную и антипролиферативную активности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00210.

- 1. Sharon N., Lis H. // Netherlands: Springer. 2007. 545 p.
- 2. Chikalovets I., Kovalchuk S., Litovchenko A., Molchanova, Pivkin M., Chernikov O. // Fish Shellfish Immunol. 2016. V. 50. P. 27–33.

Электроанализ цитохромов Р450 как мишени в поиске новых лекарственных препаратов и в исследовании межлекарственных взаимодействий

В.В. Шумянцева 1,2 , Т.В. Булко 1 , А.В. Кузиков 1,2 , Р.А. Масамрех 1,2 , А.А. Гилеп 3 , Т.В. Шкель 3 , Н.В. Струшкевич 3 , С.А. Усанов 3

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научноисследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича" (ИБМХ), Москва, ²ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, ³"Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси", Минск Электронная почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Для исследования каталитической активности цитохромов P450. высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов и ингибиторов этого надсемейства гемопротеинов, как потенциальных биокатализаторов получили развитие различные подходы, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов в сочетании с нанотехнологическими подходами, такими как электрохимические методы анализа биомолекул [1,2]. С помощью анализа электрохимических параметров цитохром Р450 3А4-электродов проведена кластеризация межлекарственных взаимодействий экзогенных субстратов (диклофенак, эритромицин, омепразол, кларитромицин) и эндогенных субстратов (тестостерон, кортизол) цитохрома P450 3A4 с целью корректировки «терапевтических окон» лекарственных препаратов [3,4]. В группу препаратов, ингибирующих активность цитохрома Р450 3A4, внесены витамины группы В, азольные ингибиторы (кетоконазол, итраконазол), абиратерон. Таурин повышал каталитическую активность цитохрома Р450 3А4 по отношению к эритромицину на 16-20%. Антиоксидантные метаболические препараты стимулировали восстановление гемопротеина, но не оказывали влияния на каталитические константы метаболических превращений тестостерона, диклофенака, эритромицина.

Таблица 1. – Классификация межлекарственных взаимодействий для корректировки

«терапевтических окон»

Ингибирующая активность.	Отсутствие влияния.	Повышение активности
Необходима корректировка	«Терапевтическое окно»	Р450. Возможна
«терапевтического окна» в	не изменяется	корректировка
сторону увеличения		«терапевтического окна» в
концентрации препарата		сторону уменьшения
		концентрации препарата
Витамины группы В (тиамин	Азафен, Липоевая	Антиоксидантные
- витамин В1, рибофлавин -	кислота, Мельдоний	метаболические препараты
витамин В2, пиридоксин -		(Мексидол, Этоксидол,
витамин В6), Кетоконазол,		Цитохром c , Таурин)
Итраконазол, Абиратерон		

Исследование выполнено при финансовой поддержке $P\Phi\Phi U$ в рамках научного проекта №18-04-00374.

- 1. Schneider E., Clark D. // 2013. Biosens. Bioelectron., V. 39. P. 1–13.
- 2. Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Bulko T.V., Archakov A.I. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 121. P.192–204.
- 3. Shumyantseva V.V., Makhova A.A., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Shich E.V., Kukes V.G., Archakov A.I. # RSC Adv. 2015. V. 5. P. 71306–71313.

Секция 4 Биологические источники природных соединений

Влияние 2-гидрокси-6,7-диглутатионил-3-этилнафтазарина на восстановление утерянных функций мозга ишемизированных крыс линии Вистар

И.Г. Агафонова, В.Ф. Ануфриев

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Электронная почта: grigorievna@mail.ru

Проблема ишемического инсульта занимает одно из основных мест в современной медицине. Последние достижения в изучении патологии головного мозга (ГМ) достигнуты благодаря современной медицинской технике, которая позволяет на молекулярном уровне предсказать и предотвратить развитие заболевания. Детальные исследования артерий ГМ, в частности эндотелия, показали, что он является таргетным звеном при развитии оксидативного стресса. Соответственно, применение препаратов, снижающих накопление супероксид-анион радикалов, предотвращение дегенеративного повреждения клеток является актуальным.

Ранее авторами [1] были исследованы антиоксидантные свойства эхинохрома (1) (лекарственная форма препарат Гистохром®) на фоне развития острого нарушения мозгового кровообращения крыс линии Вистар. Гистохром проявлял свойства непрямого вазодилататора церебральных артерий, положительно влияя на функцию эндотелия. Лекарственная форма гистохрома, содержащая карбонат натрия (pH>7), является лабильной, вследствие окисления субстанции кислородом воздуха. Альтернативой указанному препарату может стать его 2,3-диглутатионильный функциональный аналог (2), приемлемо растворимый в воде (pH=7), относительно стабильный и малотоксичный [2]. Настоящее исследование посвящено влиянию аналога на восстановление утерянных функций ишемизированного мозга крыс линии Вистар.

HOOC O H
$$H_2N$$
 H
OH OH HOOC OH
HOOC OH
HOOC OH
HOOC OH
HOOC OH
H H_2N H
COOH
HOOC OH
H H_2N H

Модель ишемии была индуцирована согласно [1]. Для нейровизуализации структуры и функции ГМ использован MP-томограф 7 TeslaPharmaScanUS 70/16 (Bruker, Germany). Первые признаки ишемии были верифицированы в диффузионно-взвешенном режиме сканирования (EPI_DWI), который дает возможность на молекулярном уровне оценить разницу изменения скорости диффузии воды в патологических участках. Получены предварительные результаты по снижению зоны отека после введения исследуемого вещества в дозе от 0,5 до 1,5 мг/кг.

На фоне развития цитотоксического отека важна своевременная терапия лекарственного препарата, который способен сдержать дальнейшее развитие заболевания. Предполагается, что исследуемое соединение 2 может быть использовано при ишемии как соединение, обладающее потенциальными антиоксидантными свойствами.

Работа выполнена при поддержке Программы ДВО РАН "Дальний Восток", грант № 18-4-003.

- 1. Agafonova I., Kotelnikov V., Geltser B., et. al. //Appl. Magn. Res. 2017. V.49. P. 217–225.
- 2. Anufriey V.P., Novikov V.L., Maximov O.B., et.al. // Bioorgan. Med. Chem. Let. 1998. V. 8. P. 587-592.

Технология получения природных полигидроксинафтохинонов из морских ежей для создания новых лечебно-профилактических препаратов

А.А. Артюков, Е.В. Купера, Т.А. Руцкова, В.В. Маханьков, В.П. Глазунов, Э.П. Козловская

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: artyukova@mail.ru (tanya1119@yandex.ru)

Морские ежи являются перспективным источником природных нафтохинонов, находящих широкое применение в фармацевтическом и пищевом производстве в качестве активного ингредиента лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД) и функциональных продуктов питания (ФПП). Хиноидные пигменты морских ежей, спинохромы, являются эхинохром (3XA)И эффективными антиоксидантами [1]. Наиболее изучен 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этилнафтохинон-1.4 (пентагидроксиэтилнафтохинон - эхинохром А). ЭХА используется в качестве субстанции для производства лекарственных препаратов серии «Гистохром», применяемых в кардиологии и офтальмологии, а также для производства БАД к пище «Тимарин» (Пат. RU2340216), «Хитохром» (Пат. RU2360683), «Золотой рог» (Пат. RU2137400). Они предназначены для профилактики атеросклероза, коронарной болезни сердца, улучшения липидного статуса крови, обеспечения антиоксидантной защиты организма (Пат. RU2337696, пат. RU2359686). Активность ЭХА в организме обусловлена улучшением снабжения периферийных тканей кислородом вследствие биологических реакций как с самими клетками, так и с отдельными ферментными системами. Помимо этого, ЭХА нашел применение в пищевой промышленности в составе композиции ФПП, например, шоколада и безалкогольных напитков (Пат. RU2644957; пат. RU2650552).

Сотрудниками лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН разработаны технологические способы производства ЭХА, защищенные патентами РФ (Пат. RU1508535, пат. RU2283298). Разработан способ консервации сырья с целью длительного хранения и способ получения ЭХА из консервированного сырья (Пат. RU2335127; пат. RU2352554).

Сырьем для производства ЭХА являются плоские морские ежи вида *Scaphechinus mirabilis*. В ходе исследований установлено, что ЭХА и спинохромы находятся в эпидермальных клетках морских ежей и могут быть выделены без разрушения кальциевого скелета ежей при подкислении экстрагента каталитическими количествами как минеральных, так и органических кислот [2].

Помимо ЭХА несомненный интерес представляют спинохромы A, B и E, также являющиеся эффективными антиоксидантами. На способы получения спинохромов A, B и E из отходов переработки промысловых видов морских ежей получены патенты РФ (Пат. RU 2362573, пат. RU2568604, пат. RU2411939). Наиболее перспективным направлением по созданию новых лекарственных средств является технология получения значительного количества спинохрома E из Mesocentrotus nudus.

Оригинальность результатов исследований и технологических разработокзаключается в получении новых биологически активных веществ морского генеза для создания эффективных лечебно-профилактических средств коррекции метаболизма организма и поддержания здоровья населения, в том числе в зонах с неблагоприятными климатическими и техногенными условиями, особенно в Арктических регионах $P\Phi$.

^{1.} Kuwahara R., Hatate H., Chkami A., Murata H., Kijidani Y. // LWT Food Sci. Technol. 2010. V. 43. P. 1185–1190.

^{2.} Дроздов А. Л., Артюков А. А., Елькин Ю. Н. // Онтогенез. 2017. Т. 48, № 4. С. 301–307.

Перспективы применения дигидрокверцетина в неврологии

Е.И. Гусев¹, В.В. Шпрах², М.Ю. Мартынов¹, В.А. Бабкин³, Л.А. Остроухова³

¹Кафедра неврологии РНИУ им. Н.И.Пирогова, ГКБ №31, Москва.

²ГБОУ ДЛО "Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования" ИГМАПО Минздрав РФ, Иркутск

³ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск Электронная почта: babkin@irioch.irk.ru

Одной из важнейших проблем современной клинической медицины являются инсульт и инфаркт миокарда. Именно эти заболевания в значительной мере обусловливают заболеваемость, инвалидность и смертность взрослого населения экономически развитых стран. В России ежегодно инсультом заболевают около 450 тысяч человек, при этом от инсульта почти 200 тысяч в течение года умирают.

Профилактика инсульта сегодня крайне актуальна. Она реально может быть осуществлена только в рамках стратегии высокого риска, позволяющей выявлять лиц, которым с большой долей вероятности угрожает развитие инсульта, и проводить им соответствующие лечебно-профилактические мероприятия. По данным эпидемиологических исследований, ранние формы сосудистых заболеваний головного мозга имеются у 15-20% лиц в возрасте 40-60 лет.

На протяжении последних лет прослеживается общемировая тенденция изыскания средств лечения неврологических заболеваний с использованием возможностей природных соединений. Натуральные биологически активные соединения, в том числе флавоноиды, заняли большое место на рынке препаратов для лечения системной ишемии, инсультов и инфарктов миокарда.

Среди флавоноидов наиболее интересным и перспективным является дигидрокверцетин, выделенный из древесины лиственницы сибирских видов (*Larix sibirica* Ledeb. и *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) [1].

Проведено изучение влияния антиоксидантных препаратов (милдронат, дигидрокверцетин, мексидол) на высшие мозговые функции у больных с сочетанным атеросклеротическим поражением коронарных и церебральных артерий без артериальной гипертензии.

Результаты нейропсихологического исследования показали, что все три препарата улучшили показатели когнитивной сферы, но в большей степени позитивное влияние на параметры высших мозговых функций оказал дигидрокверцетин, наименьшее – мексидол [2].

Иркутскими учеными (ООО ИНПФ "Химия древесины") разработан способ промышленного получения наиболее активного из четырех существующих в природе стереоизомеров дигидрокверцетина -mpanc(+)-2R3R-изомер. Известно, что именно этот природный изомер обладает наибольшей биологической активностью [3].

- 1. Бабкин В.А., Остроухова Л.А., Трофимова Н.Н. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов. Изд-во СО РАН, Новосибирск. 2011. 236 с.
- 2. Шпрах В.В., Саютина С.Б., Ромазина Т.А., Михалевич И.М. Влияние антиоксидантной терапии на когнитивные функции больных с сочетанным атеросклеротическим поражением коронарных и церебральных артерий без артериальной гипертензии / Российская научно-практическая конференция "Нарушение мозгового кровообращения. Патофизиология, клиника, диагностика, лечение". Барнаул, 2008, с.114.
 - 3. Бабкин В.А. // Химия Растительного Сырья. 2014. № 3. С. 111-119.

O-Гликозидгидролазы культивируемых бактериальных изолятов тихоокеанской красной водоросли Ahnfeltia tobuchiensis

Электронная почта: bakun@list.ru

В дальневосточных морях России неприкрепленная к субстрату красная водоросль Ahnfeltia tobuchiensis (Kanno et Matsubara) Макіепко формирует обширные пласты на илистом или илисто-песчаном грунте, которые могут занимать несколько десятков квадратных километров поверхности дна. Этот вид является важным компонентом морских экосистем благодаря его вкладу в очистку прибрежных вод, подверженных антропогенному загрязнению. Кроме того, A. tobuchiensis имеет значительную экономическую ценность как промышленный источник агара. Этот полисахарид нашел широкое применение в микробиологии и различных отраслях пищевой промышленности.

Хорошо известно, что в большинстве случаев эпифитные бактериальные сообщества весьма видоспецифичны. Многие штаммы бактерий, выделенные из разных водорослей, способны разлагать сахара, продуцируемые водорослями-хозяевами, такие как альгинат, целлюлоза и др. Считается, что они участвуют в процессе распада водорослей благодаря комплексу различных ферментов-карбогидраз.

С поверхности красной водоросли A. tobuchiensis были впервые выделены 284 чистые культуры бактерий. Детальное изучение профилей О-гликозидгидролаз было проведено среди 92 штаммов гетеротрофных бактерий. Сравнительный филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК показал, что полученные бактерии-продуценты характеризовались богатым видовым разнообразием и относились к 69 филотипам четырех филумов, среди которых доминировали Bacteroidetes и Proteobacteria, а представители Actinobacteria и Firmicutes были менее нумерически значимы. При полифазном анализе таксономической структуры данного сообщества было установлено таксономическое положение двух новых для науки штаммов флавобактерий, которые обладали гликозидгидролазной активностью и были валидно описаны как Flavobacterium ahnfeltiae sp. nov. и Polaribacter staleyi sp. nov. [1,2]. В результате скрининга были отобраны штаммы, показавшие наиболее высокие активности гликаназ и гликозидаз. Продуценты гликаназ включали членов 14 родов, среди которых наиболее часто встречались Winogradskyella и Zobellia филума Bacteroidetes. Высокая активность гликозидаз отмечена у 16 штаммов, принадлежащих к 9 родам, с преобладанием представителей Amylibacter филума Proteobacteria, Salinibacterium филума Actinobacteria и Zobellia филума Bacteroidetes.

Практически все сырые экстракты штаммов проявляли активность α-амилазы и α-глюкозидазы. Активности полиманнуронат-лиаз, ламинариназ, полигулуронат-лиаз также отмечены практически во всех экстрактах. Редко встречаются продуценты α-N-ацетилгалактозаминидазы, фукоиданазы и каррагиназы. Полученные данные показали, что культивируемые бактерии красной водоросли *А. tobuchiensis* характеризуется богатым видовым разнообразием и высоким метаболическим потенциалом, который позволяет им определять жизненную стратегию и играть важную роль в их взаимоотношениях с организмом-хозяином.

^{1.} Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Kim S-J, Bakunina I.Y., Rhee S.K.// Arch. Microbiol. 2014. V. 196. P. 745–752.

^{2.} Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Bakunina I.Y., Mikhailov V.V. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 623–629.

Влияние ферментов морских бактерий на экспрессию генов регуляции биопленки

<u>Л.А. Балабанова^{1,2}</u>, А.Б. Подволоцкая², Л.В. Слепченко^{1,2}, И.Ю. Бакунина¹, Д.М. Черанева², Л.А. Текутьева², Ю.Н. Шкрыль³

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток
³Федеральный научный центр биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток
Электронная почта: balaban@piboc.dvo.ru

В условиях роста антибиотикорезистентности патогенов метаболиты морских бактерий, обладающие антимикробной активностью, представляют огромный интерес для создания новых подходов борьбы с ними, потому что могут задействовать неизвестные метаболические пути у антагонистов. У морских бактерий *Cobetia amphilecti* КММ 296 и *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 кандидатами в активные метаболиты могут быть гидролитические ферменты [1,2]. При нанесении высокоактивной щелочной фосфатазы *Cobetia amphilecti* КММ 296 или альфа-галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 на зрелую биопленку *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* уже через несколько часов наблюдался видимый эффект ее разрушения [1,2].

Для установления механизма действия ферментов морских бактерий на пленкообразующие свойства штамма *P. aeruginosa*, выделенного из окружающей среды,провели оценку уровня экспрессии его генов в присутствии разной концентрации ферментов в инкубационной среде методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием геноспецифичных олигонуклеотидов. Выбор генов проводили методом секвенирования полногеномной последовательности нашего штамма *P. aeruginosa* и биоинформатического анализа локусов генов, ответственных за регуляцию систем «чувства кворума» и синтез экзополисахаридов. Анализ локуса PAO572, содержащего гены сигнальной трансдукции lasI/rhII, показал существенное отличие ключевых генов свободноживущей псевдомонады и референсных клинических штаммов.

Полученные данные ПЦР в режиме реального времени кластеризовали 14 исследованных генов на 5 групп по паттерну положительной или отрицательной регуляции их экспрессии в ответ на действие альфа-галактозидазы. Щелочная фосфатаза индуцировала всплеск экспрессии лишь одного гена, кодирующего фосфодиэстеразу, содержащую специфический домен HDGYP, участвующую в регуляции сигнальной молекулы дигуанилата (c-di-GMP). Полученные результаты подтверждают сложность дозозависимого механизма влияния гидролаз морских бактерий на пленкообразование.

Работа выполнена в рамках темы программы «Дальний Восток» № 18-4-051

^{1.} Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Yu., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. // Food Control. 2017. V. 78. P. 270–278.

^{2.} Слепченко Л.В., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Исаков В.В. // Вестник ДВО РАН. 2017. № 2. С. 51–58.

Оптимизация производства рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии Cobetia amphilecti

 $\underline{\text{H.C. Буйновская}^1}$, Ю.А. Носкова 1 , В.С. Христенко 1 , Л.В. Слепченко 1,2 , Л.А. Текутьева 2 , Л.А. Балабанова 1,2

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Инновационный технологический центр ДВФУ, Владивосток Электронная почта: ninok1993@mail.ru

Условия морской среды, включающие низкую температуру, высокое давление и соленость, выработали у обитателей моря способность синтезировать ферменты с более высокой каталитической эффективностью и необычной специфичностью по сравнению с наземными аналогами. До сих пор остаются неизученными структурные особенности и биологические функции таких ферментов. Так, у рекомбинантной щелочной фосфатазы из морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 269 (CmAP) с более высокой фосфатазной активностью (≥12000 ДЭА ед/мг) среди известных аналогов была обнаружена биологическая активность в отношении патогенных бактерий и раковых клеток [1,2,3]. Такие функциональные особенности высокоактивной рекомбинантной фосфатазы CmAP, как способность дефосфорилировать бактериальные ЛПС, подавлять образование биопленок и рост клеток некоторых видов рака, являются основанием для дальнейших исследований механизмов ее действия, которые могут привести к разработке нового противовоспалительного или противомикробного средства, или метода изучения онкопатогенеза.

Для проведения клинических испытаний требуется большое количество гомогенного препарата белка, что невозможно выполнить при проведении предложенной ранее схемы выделения и очистки рекомбинантной *Ст*АР [4]. В предыдущих работах из 1 литра бактериальной культуры удавалось получать 1 мг очищенного препарата с удельной фосфатазной активностью 12000 ед/мг в 1-М диэтаноламиновом (ДЭА) буфере при рН=10,3 [5].

Нами разработана и оптимизирована новая схема выделения рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP, в результате применения которой из 1 литра бактериальной культуры выход гомогенного целевого белка достигает 9 мг с удельной активностью 24000 ДЭА ед/мг. Проведение этапа градиентного осаждения сульфатом аммония после ультразвуковой дезинтеграции бактериальных клеток, металлоафинной хроматографии в присутствии 20% глицерина и диализа против буфера с 50% глицерином перед обработкой энтерокиназой позволило многократно увеличить эффективность очистки препарата высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP— в 9 раз по выходу белка и в 2 раза по степени очистки, по сравнению с показателями предыдущих схем выделения белка.

Работа выполнена в рамках темы программы «Дальний Восток» № 18-4-051.

- 1. Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Yu., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. // Food Control. 2017. V. 78. P. 270–278.
- 2. Balabanova L. A., Slepchenko L. V., Buinovskaya N. S., Likhatskaya G. N., Kuzmich A. S., Portnyagina O. Yu., Novikova O. D., Bakunina I. Yu., Shkryl Yu. N., Kovalchuk S. N. // ВестникДВОРАН. 2018. № 6. С.76–77.
 - 3. Buinovskaya N. S., Bakholdina S. I., Balabanova L. A. // ВестникДВОРАН. 2018. № 6. С.80–81.
 - 4. Пат. 2447151 // Балабанова Л.А., Рассказов В.А., 2012.
- 5. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. // Mar. Biotechnol. 2015. V. 17, N 2. P. 130–143.

Каротиноиды и степень родства некоторых видов двустворчатых моллюсковфильтраторов черноморского региона

А.В. Бородина 1 , П.А. Задорожный 2

¹Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", Севастополь

²Институт химии ДВО РАН, Владивосток
Электронная почта: borodinaav@mail.ru

Известно, что биосинтез каротиноидов осуществляется автотрофами, такими как растения, микроводоросли, некоторые бактерии, а также грибами. У всех консументов следующих трофических уровней эти соединения накапливаются через усвоение пищи и могут подвергаться дальнейшей трансформации в зависимости от вида консумента. Морские двустворчатые моллюски-фильтраторы – наиболее распространенное трофическое звено, в котором происходит непосредственное преобразование растительных каротиноидов фитопланктона. В первую очередь, накопление каротиноидов, как и их функции в организме, регулируется ферментами и напрямую связано с геномом организма. Важную роль играют также пищевая депривация, сезонность, нерест и другие факторы, замечено также, что один и тот же вид моллюска-фильтратора в разных регионах Мирового Океана приобретает отличия в составе каротиноидов.

Целью работы было провести анализ состава каротиноидов двустворчатых моллюсков-фильтраторов разных таксономических групп, взятых из одного черноморского региона. В работе представлены результаты исследований состава каротиноидов 6 видов черноморских моллюсков: Mytilus galloprovincialis, Anadara kagoshimensis, Crassostrea gigas, Cerastoderma glaucum, Paphia aurea, Chamelea gallina.

Разделение и идентификацию каротиноидов моллюсков проводили методами тонкослойной и высокоэффективнойхроматографии, масс-спектрометрии и ЯМР-спектрометрии.

Для всех исследованных двустворчатых моллюсков были общими 2 каротиноида растительного происхождения: В-каротин и диатоксантин. На следующем уровне родства (подкласса) к предыдущим двум общим пигментам прибавляются еще несколько каротиноидов, причем в каждом подклассе эти группы могут быть разными, что также объединяет организмы, относящиеся к такому типу родства. Результаты исследований каротиноидов моллюсков принадлежащих одному надотряду (на примере Imparidentia) также показали около половины общих каротиноидов в составе видов. В пределах одного семейства большая часть каротиноидов повторяется. На видовом уровне можно отметить наличие видоспецифичных каротиноидов, характерных для данного вида, так, например, для C. gigas это группа каротиноидов красостреаксантина (A и B) и их эфиров. Рассмотрены схемы метаболических превращений и возможные предшественники видоспецифичных каротиноидов. Несмотря на то, что исследование закономерностей в накоплении каротиноидов у различных видов нуждается в расширенном анализе, прослеживается четкая закономерность: по мере увеличения степени родства отличия в составе каротиноидов двустворчатых моллюсков-фильтраторов уменьшаются. Это свидетельствует о том, что по мере сближения родства между видами, происходит преобладание все более сходных механизмов ассимиляции и усвоения из пищевого субстрата и метаболических преобразований каротиноидов в тканях моллюсков.

Тема гос. задания ФГБУН ИМБИ РАН "Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом". Рег. номер НИОКТР АААА-А 18-118021490093-4; дата рег. 14.02.2018 г.

Докинг, молекулярная динамика и связь структура-активность биомолекул

Г.Н. Лихацкая

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: galinlik@piboc.dvo.ru

Структурная биоинформатика - новое научное направление для изучения структуры и функции биомолекул и установления связи структура-активность в настоящее время широкое применение в биорганической химии благодаря компьютерных технологий и интернета. В ТИБОХ ДВО РАН с начала 2000-ых годов проводятся исследования методами структурной биоинформатики взаимодействия природных низкомолекулярных биорегуляторов с белками-мишенями [1], установления пространственной структуры белков и пептидов [2,3], ферментов и лектинов из морских организмов [4,5]. Проведено моделирование структуры олигосахаридов хитозана и каррагинанов различного строения, их полиэлектролитных комплексов и комплексов олигосахаридов с липополисахаридом и с клеточными рецепторами. взаимодействие тритерпеновых гликозидов с белками вирусов иммунодефицита человека и герпеса. Построены модели интегрального белка наружных мембран бактерий разных видов рода Yersinia (поринов) и методами молекулярной динамики показаны изменения в их структуре от температуры. Дано возможное объяснение различного изменения спектров флуоресценции OmpF и OmpC при повышенной температуре. Построены модели комплексов поринов с антибиотиками и антителами. Для ферментов из морских организмов получены структуры комплексов с молекулами субстрата, ингибиторами и акцепторами. Построены модели бифункциональных комплексов щелочной фосфатазы и лектинов. В экспериментах по in silico мутагенезу показано, каким образом может быть изменена активность лектина и было получено экспериментальное подтверждение такого изменения Результаты получены [5]. с использованием оборудования "Дальневосточный вычислительный ресурс" ИАПУ ДВО РАН (https://cc.dvo.ru).

- 1. Лихацкая Г.Н., Анисимов М.М., Трифонов Е.В., Нурминский Е.А. // III Съезд биофизиков России, Воронеж. 24-29 июня 2004: Тез. докл. 2004. Т. I. С. 63-64.
- 2. Лихацкая Г.Н., Зыкова Т.И., Монастырная М.М., Козловская Э.П., Трифонов Е.В., Нурминский Е.А. // Рос. симп. по химии и биологии пептидов. Москва, 17-19 нояб. 2003: Тез. докл. -М. 2003. С. 36.
- 3. Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. // J Biomol Struct Dyn. 2005. V. 23(2). P.163-174.
- 4. Bakunina I., Likhatskaya G., Slepchenko L., Balabanova L., Tekutyeva L., Son O., Shubina L., Makarieva T.// Marine drugs. 2019. V. 17 (1), 22. doi:10.3390/md17010022.
- 5. Kovalchuk S.N., Buinovskaya N.S., Likhatskaya G.N., Rasskazov V.A., Son O.M., Tekutyeva L.A., Balabanova L.A. // Marine Drugs. 2018. V. 16(12). pii: E471. doi: 10.3390/md16120471.

Экология и таксономия грибов морских растений

М.В. Пивкин, Н.Н. Киричук, Ю.В. Худякова

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: oid27@mail.ru

Среди морских сообществ автотрофные сообщества занимают особое место. Существует три основных типов автотрофных сообществ бентоса в море. Это сообщества макрофитов, мелководных кораллов с симбиотическими водорослями и глубоководных гидротерм. Их продуктивность превышает продуктивность сельскохозяйственных культур и тропических лесов.

Видовое богатство грибов морских макрофитных сообществ изучено незначительно. Таксономический состав микромицетов вторичных морских грибов, ассоциированных с бурыми водорослями рода Sargassum (S. pallidum, S. miyabei) Японского моря, включает 29 видов мицелиальных грибов из 11 родов, подавляющая часть которых относится к факультативным морским грибам, и только 3 вида известны как облигатные морские микромицеты — Asteromyces cruciatus, Paradendryphiella arenariae, Halosigmoidea marina. Проведен сравнительный анализ видового разнообразия грибов, ассоциированных с двумя видами бурых водорослей рода Sargassum. Выявлено, что видовое разнообразие мицелиальных грибов, ассоциированных с S. pallidum, в 3 раза выше, чем разнообразие микромицетов на S. miyabei. Анализ видового разнообразия микромицетов показал, что комплексы грибов на изученных видах водорослей сходны всего на 24 %.

Морская трава Zostera marina L. (взморник) произрастает на зашишенных участках акваторий, где образует обширные заросли, стабилизирующие акваземы. Мицелиальные ассоциированные с морскими травами, до сегодняшнего дня остаются малоизученной группой микроорганизмов. В результате исследований микобиоты морской травы Zostera marina и акваземов в местах ее обитания выделено и идентифицировано 28 видов мицелиальных грибов, относящихся к девяти родам. Среди них подавляющее большинство относилось к факультативным морским грибам и только Paradendryphiella arenariae и Monodictys pelagica являлись облигатными видами. Наиболее разнообразно по сравнению с другими родами был представлен род Penicillium (13 видов), вторым по числу видов был род Trichoderma (6 видов). Отмечено по 2 вида родов Cladosporium и Aspergillus, а также по одному виду родов Paradendryphiella, Monodictys, Beauveria, Arthrinium и Acremonium. Представители рода Penicillium доминировали по численности, самыми массовыми среди них были P. thomii, P. glabrum и P. simplicissimum. Разнообразие микромицетов в акваземах, отобранных в местах произрастания Z. marina, также в основном определяли виды рода *Penicillium*. Из 12 видов, принадлежавших к четырем родам, 7 видов относились к роду Penicillium, 3 - к роду Trichoderma (T. longibrachiatum, T. viride, T. harzianum).

Грибы зелёных водорослей практически не изучались. Наши исследования микобиоты зелёных водорослей: *Ulva flexuosa*, *Ulva lactuca*, *Ulva linza*, показало, что видовой состав их грибного населения радикально отличается от грибов бурых водорослей и морских трав. Доминируют на поверхности водорослей грибы родов *Alternaria* и *Pestolotiopsis* (*A. litorea*, *A. tennuisima*, *A. alternata* и *Pestalotiopsis* spp.).

Многие аспекты морской микологии требуют самого пристального внимания, начиная с разнообразия морских грибов и их географической приуроченности и заканчивая их адаптационными стратегиями и ролью в морских экосистемах. Основной задачей наших исследований является изучение биоразнообразия, экологических свойств и биотехнологического потенциала микроскопических грибов в их взаимосвязи, а также сохранение штаммов *ex situ*.

Разнообразие пептаиболов, синтезируемых экстремофильным грибом Emericellopsis alkalina: структура и особенности биологической активности

Е.А. Рогожин^{1,2,3}, И.А. Гаврюшина², А.Е. Куварина², В.С. Садыкова²

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;
²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва;
³Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (ХВіо) Тюменского государственного университета, Тюмень

Электронная почта: rea21@list.ru

Научная проблема поиска продуцентов новых антибиотиков среди микроорганизмов, обитающих в необычных и труднодоступных местах, на протяжении продолжительного времени не теряет своей актуальности в связи с тем, что в этом случае повышается вероятность обнаружения у данных организмов новых свойств, некоторые из которых являются факторами адаптации к таким условиям. Одним из таких генеральных аспектов адаптации является антагонизм, реализуемый, в частности, путем синтеза ряда биологически активных метаболитов, обладающих различными типами действия по отношению, в первую очередь, к сопутствующей микробиоте (другим видам бактерий, грибов, а также к эволюционно более развитым организмам, например, к почвенным нематодам, насекомым и др.). Экстремофильные грибы рода Emericellopsis представляют собой уникальные организмы, которые реализуют свой жизненный потенциал посредством обитания в условиях с высокими значениями рН, что позволяет им, в частности, занимать приоритетную доминирующую экологическую нишу. Один из таких путей реализации на молекулярном уровне заключается в нерибосомальном биосинтезе группы относительно коротких полипептидов, состоящих преимущественно из остатков нестандартных аминокислот. Их название – пептаиболы – генерируется из-за обязательного присутствия в структуре, по крайней мере, одного остатка α-аминоизомасляной кислоты (Aib), а также восстановления карбоксильной группы С-концевого аминокислотного остатка в спиртовую. Вид E. alkalina интересен продукцией одного преобладающего секретируемого пептаибола. названного эмерицеллипсином А, и обладающим направленным антимикробным действием по отношению преимущественным образом к мицеллиальным и дрожжеподобным патогенным грибам [1-2]. В рамках настоящего исследования был проведен анализ комплекса минорных соединений, которые ранее показали выраженный антимикробный эффект [1]. В результате структурного анализа данных фракций методом тандемной хроматомасс-спектрометрии высокой точности (ESIMS/MSHR) было идентифицировано 10 новых структурных гомологов эмерицеллипсина А, содержащих преимущественным образом единичные вариабельные аминокислотные замены в полипептидной цепи. Проверка их антифунгальной активности по отношению к модельным мицеллиальных (Aspergillus niger) и дрожжеподобных (Candida albicans) грибов на качественном уровне выявила высокий уровень ингибирования, сопоставимый с таковым для концентрата, содержащего эмерицеллипсин А. Дальнейшие эксперименты в плане структурно-функционального изучения позволят новых гомологов выявить аминокислотные остатки – локальные детерминанты, определяющие их функциональность.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073).

^{1.} Баранова А.А., Георгиева М.Л., Биланенко Е.Н., Андреев Я.А., Рогожин Е.А., Садыкова В.С. // Прикл. биохим. микробиол. 2017. Т.53. № 6. С. 616–624.

^{2.} Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kul'ko A.B., Krasheninnikov M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A. // Molecules. 2018. V. 23. E. 2785.

Агробактериальная трансформация мицелиального гриба *Thermothelomyces* thermophila для получения рекомбинантных белков

А.В. Сейткалиева 1 , Ю.Н. Шкрыль 2 , Ю.А. Югай 2 , Л.В. Слепченко 1,3 , М.В. Марченок 3 , Л.А. Текутьева 3 , Л.А. Балабанова 1,3

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Федеральный научный центр биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток ³Инновационный технологический центр ДВФУ, Владивосток Электронная почта: sasha0788@inbox.ru

Мицелиальный термофильный гриб *Thermothelomyces thermophila* обладает высокой способностью к деструкции сельскохозяйственных отходов растительного происхождения, поэтому его штаммы могут быть перспективными продуцентами не только ферментов целлюлолитического комплекса, но и ценных рекомбинантных белков, особенно эукариотического происхождения.

Для получения трансгенных штаммов гриба *Th. thermophila* F-859 нами разработаны подходы для метаболической инженерии мицелиальных грибов с использованием агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Агробактериальная трансформация включала совместное культивирование клеток агробактерий и конидий микромицета для их трансфекции Ti-плазмидными последовательностями, содержащими чужеродные гены.

Для этой цели были сконструированы бинарные векторы, содержащие одновременно несколько генов рекомбинантых белков под разными промоторами. В качестве селективного маркера трансформации выбран ген устойчивости к гигромицину (hph) на основе исследований устойчивости *Th. thermophila* F-859 к антибиотикам. Гигромицин полностью ингибировал рост мицелия при концентрации 50 мкг/мл на агаризованной картофельной среде (PDA).

В бинарные векторы pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TrpC:Z19/AmA1 и pPZP-RCS2-TrpC:Hyg-TEF:Z19/AmA1 последовательно встроили экспрессионные кассеты TrpC-hph, для направленного синтеза гигромицин В фосфотрансферазы (*Hph*) под контролем промотора TrpC *Aspergillus nidulans*, и TrpC-z19/ama1 или TEF-z19/ama1 для направленного синтеза запасных белков Z19 из кукурузы *Zeamayz* и AmA1 из амаранта *Amaranthus hypochondriacus L*. под контролем промоторов TrpC или TEF— промотора *Aureobasidium pullulans* соответственно.

Подобраны оптимальные условия для выращивания трансгенных культур *Th. thermophila*. Митотическая стабильность подтверждена устойчивостью трансформанта к гигромицину в пяти генерациях клеток (конидий).

Результаты количественной оценки экспрессии генов трансгенных штаммов *Th. thermophilus* показали стабильный и высокий уровень синтеза трех рекомбинантных белков. Однако уровень транскриптов кукурузного гена *z*19 под контролем промотора метаболического пути синтеза триптофана TEF в несколько раз был выше, чем под контролем промотора фактора транскрипции TrpC. И наоборот, рекомбинантный запасный белок амаранта AmA1 более эффективно синтезировался с гена, находящегося под контролем TrpC.

Таким образом, мицелиальный гриб *Th. thermophila* можно широко использовать как хозяина бинарных векторов, что позволит осуществлять высокоэффективный синтез сразу нескольких рекомбинантных белков.

Работа выполнена в рамках темы программы «Дальний Восток» № 18-4-051.

Комплексы фотодитазина с европием для фотодинамической терапии рака

<u>О.В. Таракова^{1,2,3}</u>, Н.Р. Панкратов⁴, А.П. Фильштейн¹, М.А. Медков², В.И. Апанасевич⁴, И.Г. Тананаев³, П.А. Лукьянов¹

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Институт химии ДВО РАН, Владивосток

³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток ⁴Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток

Электронная почта: tarakovaolga@gmail.com

Фотодинамическая терапия (ФДТ) рака представляет собой один из интенсивно развивающихся способов лечения злокачественных новообразований. Метод основан на введении онкобольным фотосенсибилизаторов (ФС), способных избирательно накапливаться преимущественно в опухолевых тканях. В результате при лазерном облучении ФС вступают в фотодинамические реакции, продуцируя активные формы кислорода (ROS), которые вызывают окислительное повреждение клеток опухоли, приводящее к их гибели.

Данный метод может быть применим только для меланом и кожных инфекций, поскольку световые кванты лазера не способны проникать в ткани на глубину более 4 мм, что обуславливает невозможность лечения полостных новообразований.

Отечественный препарат второго поколения — фотодитазин (глюкаминовая соль хлорина E6) является одним из широко используемых в ФДТ. Проводить ФДТ опухолей глубинной локализации возможно благодаря бинарным комплексам фотодитазина с европием, который люминесценцирует при гамма-облучении. Константа связывания такого комплекса составляет всего $4,4~{\rm M}^{-4}$ и каждый ион Eu^{3+} связывает 4 молекулы хлорина E6. Это низкоаффинное взаимодействие: такой комплекс может достаточно быстро диссоциировать.

Для получения более стабильного комплекса был синтезирован мультимодальный конъюгат на основе полиэтиленимина с ковалентно связанными хлорином E6, хелатором ионов Eu^{3+} и фолиевой кислотой для таргетной доставки к раковым клеткам с высокой экспрессией рецепторов фолиевой кислоты.

Полученные препараты не токсичны для клеток рака молочной железы T-47D в концентрации 200 мкг/мл и ниже. Реактивность хлорина E6 в комплексах подтверждалась генерацией ROS при УФ-облучении. Передача энергии люминесценции от ионов Eu³⁺ на молекулу хлорина E6доказана при γ -облучении полученных комплексов. Показано, что доза 2 Гр является корректной для эффективной генерации ROS полученными конъюгатами при концентрации 25-200 мкг/мл.

Таким образом, получены молекулярные комплексы фотодитазина с европием, перспективные для ФДТ глубинных опухолей при гамма-облучении, что, в свою очередь, может повысить результативность стандартной радиотерапии.

Работа выполнена при поддержке Президиума ДВО РАН (грант 18-3-042).

Стендовыедоклады Секция 1 Органический синтез природных соединений

Проблемы О-алкилирования 2-гидроксинафтазаринов, не содержащих заместителей в положении 3, под действием триэфиров ортокарбоновых кислот. II

Н.Н. Баланева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: balaneva@piboc.dvo.ru

2-Гидроксинафтазарины типа 1-4 используются как ключевые полупродукты в синтезах многих природных полигидрокси-1,4-нафтохинонов и родственных им соединений. Субстрат 2, например, является ключевым полупродуктом в синтезах пигментов морских ежей — эхинохрома A [1] и спинохрома D [2]. В ходе этих синтезов осуществлялось нуклеофильное замещение обоих атомов Cl на MeO-группы под действием системы реагентов MeOH/CsF/Al $_2$ O $_3$, что требовало предварительной защиты C(2)-OH группы в виде алкилового эфира.

$$R^1$$
 ОН О R^1 ОН 1 - 4, где $R=H$, а $R^1=H$ (1), CI (2), Me (3), OMe (4) $R^1=H$ (1), CI (2), Me (3), OMe (4) $R^1=H$ ОН О $R^1=H$ алкил, алкоксил, гидроксил или галоид

Среди известных реагентов для защиты β -OH групп субстратов типа **5** наилучшим является триэтилортоформиат $HC(OEt)_3$ [3]. К сожалению, этот реагент не пригоден для защиты β -OH группы субстратов **1** – **4**. Так, реакция **3** с избытком $HC(OEt)_3$ (т. кип., 1.5 ч) дала эфир **6** с выходом 4.5%, а правильную структуру основного продукта реакции не удалось установить [3].

Нами показано, что при кипячении растворов $\mathbf{1} - \mathbf{4}$ в избытке $HC(OEt)_3$ (15-60 мин) образуются продукты трех типов. Доминирующими являются 1,4,9,12-тетрагидрокси-14а-этокси-14аH-дибензо[b,h]ксантен-5,6,8,13(5H)-тетраоны $\mathbf{7} - \mathbf{10}$ (65-75%) со скелетом мирабихинона – метаболита морского ежа *Scaphechinus mirabilis* [4], а минорными – эфиры типа $\mathbf{6}$ (5-10%) и трис-(2,5,8-тригидрокси-1,4-нафтохинон-3-ил)метаны $\mathbf{11} - \mathbf{14}$ (2-4%), которые становятся доминирующими продуктами (50-60%) при разбавлении ортоэфира инертным растворителем (PhH или MeCN, 1:1 по объему, т. кип., 30-60 мин).

$$R^{1} = H$$
 (7), CI (8), Me (9), OMe (10) $R^{1} = H$ (11), CI (12), Me (13), OMe (14)

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021)

- 1. Ануфриев В.Ф., Баланева Н.Н., Новиков В.Л., Кольцова Е.А., Еляков Г.Б., Максимов О.Б. // Патент РФ 1821022: (1989); Б.И.. 1993. № 21.
- 2. Баланева Н.Н., Шестак О.П., Ануфриев В.Ф., Новиков В.Л. // Химия природ. соедин. 2016. № 2. С. 187–191.
- 3. Anufriev V.Ph., Novikov V.L., Malinovskaya G.V., Glazunov V.P. // Synth. Commun. 1997. V. 27. No. 1. P. 119–126.
 - 4. Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A. // Tetrahedron Lett. 2014. V. 55. P. 5967–5969.

О механизмах реакций 2-гидроксинафтазаринов разного структурного типа с триэфирами ортокарбоновых кислот. IV

В.Л. Новиков, Н.Н. Баланева, О.П. Шестак, В.П. Глазунов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: shestak@piboc.dvo.ru

О-Метиловые эфиры гидроксинафтазаринов часто встречаются в природе. Они также широко используются в синтезах разнообразных природных полигидроксинафтазаринов и их аналогов. В ходе этих синтезов возникает потребность защиты β-ОН-группы субстратов типа 1 в виде О-алкиловых эфиров.

Ранее нами был разработан метод защиты таких β -ОН групп в виде Et- или Me-эфиров под действием триалкилортоформиатов $HC(OR)_3$, где R=Et или Me [1].

Оказалось, что метод дает хорошие результаты лишь в случае субстратов типа **1**. С субстратами типа **2** реакции с триалкилортоформиатами дают ожидаемые Еt- или Меэфиры с очень низкими выходами (2-8%), а основными продуктами являются в зависимости от условий смеси Еt- или Ме-кеталей типа **3** (65-75%) и тримеров типа **4** (50-60%).

В то же время триметилортоацетат $MeC(OMe)_3$ эффективно защищает β -OH группы субстратов типа **2** в виде OMe-эфиров (80-95%) [2].

различающиеся химические свойства триалкилортоформиатов триметилортоацетата в реакциях с субстратами типа 1 и 2 привели нас к необходимости теоретических исследований механизмов этих реакций. Для субстратов типа 1 (R=Me, R^1 =H) и 2 (R=H) были рассмотрены три возможных механизма реакции с $HC(OMe)_3$: ионный, радикальный и концертный (согласованный). В квантово-химических расчетах величин $\Delta H_{\text{реак}}$ использовались методы B3LYP/6-311(d), PCM/MeCN и B3LYP/6-311++(d,p), PCM/MeCN. Показано, что и «нормальные» (Еt- или Me- эфиры по C-(2)-OHгруппе 1 и 2) и «аномальные» (соединения типа 3 и 4 в случае субстратов 2) продукты этих реакций образуются из одних и тех же интермедиатов, где остов субстрата связан с остатком ортоэфира С-С связью в положении 3. В случае МеС(ОМе)₃ эти два фрагмента могут быть связаны только О-С связью, так как стерические препятствия, создаваемые протонами С-Ме-группы ортоэфира, не позволяют остатку ортоэфира связаться С-С связью с субстратом, что и ведет к образованию лишь ОМе-эфиров. Радикальный механизм этих реакций энергетически наиболее выгоден.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021).

- 1. Anufriev V.Ph., Novikov V.L., Malinovskaya G.V., Glazunov V.P. // Synth. Commun. 1997. V. 27. N 1. P. 119–126.
 - 2. Баланева Н.Н., Шестак О.П., Новиков В.Л. // Изв. АН. Сер. хим. 2019. № 1. С. 55–63.

Амиды цианенонового производного 18βH-глицирретовой кислоты: синтез и биологическая активность

<u>О.В. Саломатина^{1,2},</u> Е.В. Жиляева^{1,2}, Е.Б. Логашенко², М.А. Зенкова², Н.Ф. Салахутдинов^{1,3}, А.В. Марков²

¹Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск ³Новосибирский государственный университет, Новосибирск Электронная почта: ana@nioch.nsc.ru

Цианеноновые производные тритерпеновых соединений являются объектами пристального внимания научного сообщества как перспективные лекарственные агенты [1]. Синтезированное ранее нами цианеноновое производное 18βН-глицирретовой кислоты – солоксолон метил (1) – показало широкий спектр биологической активности в тестах *in vitro* и *in vivo*: противовоспалительная, противовирусная, противоопухолевая и иммуномодулирующая, – что позволяет рассматривать его как перспективный мультитаргетный лекарственный агент [2-4].

В продолжение наших исследований с целью получения производных с усиленным и/или более селективным действием, нами был синтезирован ряд амидных производных Солоксолона взаимодействием с аминами, содержащими еще одну дополнительную функциональную группу – гидроксильную (с линкерами С2, С3 и С5, также производное диэтаноламина), ароматическую (п-броманилин, п-метиланилин и 3-аминопиридин), а также с биоактивными аминами (триптамином и 4-(3-аминопропил)-2,6-трет-бутилфенолом).

Используемый нами метод с предварительной активацией карбоксильной группой CDI показал хорошую применимость ко всем типам используемых аминов, в том числе и

кислоточувствительным (триптамин), искомые амиды получаются хорошими c выходами (выше 60%). полученные соединения были выделены В индивидуальном виде, структура подтверждена методами ЯМР 1 Н и 13 С, а также масс-спектрами высокого разрешения. Соединения исследованы в тестах in vitro в отношении жизнеспособности клеток рака шейки матки HeLa, аденокарциномы легких А549, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и нетрансформированных фибробластов hFF3.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований НИОХ СО РАН № 0302-2019-0003, при поддержке гранта РНФ № 17-75-20120

- 1. Salvador J.A.R. et al. Chapter 2- // Stud. Nat. Prod. Chem. 2014. V. 41. P. 33-73.
- 2. Logashenko E.V., Salomatina O. V., Markov A.V. et al. // ChemBioChem. 2011. V. 12. P. 784-794.
- 3. Salomatina O.V., Markov A.V., Logashenko E.B. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22, N 1. P. 585–593.
 - 4. Markov A.V., Sen'kova A.V., Warszycki D. et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 13968.

Взаимодействие нафтопурпурина и момпаина и их метиловых эфиров с аммиаком

О.П. Шестак

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: shestak@piboc.dvo.ru

В морских ежах недавно обнаружены аминозамещенные 5,8-дигидрокси-1,4-нафтохиноны (нафтазарины) — эхинамины А и В [1] и спинамин Е [2], что вызвало интерес в развитии методов аминирования гидроксинафтазаринов. Среди них более практичны методы прямого аминирования аммиаком, описанные в работах [1,3-6]. В этих работах, однако, не уделялось особого внимания рассмотрению механизмов реакций.

Цель данной работы — изучение строения продуктов реакций пигментов морских ежей ${\bf 1}$ и ${\bf 2}$ и их Ме-эфиров ${\bf 3}$ и ${\bf 4}$ с 25%-ным водным аммиаком и 7N раствором NH_3 в MeOH.

Реакции нафтопурпурина **1** с водным NH₃ и с раствором его в MeOH протекали очень быстро (22°C, 15–20 мин), давая аминопроизводное **5** с выходом 90-93% (все продукты изображены в доминирующей таутомерной форме). Увеличение времени реакции (2–8ч) приводило к образованию аммонийного основания **6** (82%, водный NH₃) или его аммонийной соли **7** (88%, раствор NH₃ в MeOH). Ме-эфир **3** реагировал с водным NH₃ медленнее (22 C, 40мин), давая аминопроизводное **8** (70%). В отличие от **1** реакция **3** с NH₃ не была региоспецифичной. Получены также аминопродукт **9** (11%) и аминонафтазарин **10** – продукт *ипсо*-атаки NH₃ по C-2 субстрата **3** (3%). Увеличение времени реакции (22 C, 48 ч) дало смесь диаминопроизводных **11** (36%) и **12** (6%), существующих в *ана*-хиноидной форме.

Реакция момпаина **2** с водным NH₃ (22 C,2,5ч) дала смесь аминопродуктов **13** (80%) и **14** (7%). По данным спектров ЯМР 1 Н и 13 С соединение **14** находится в состоянии вырожденной енамино-иминной таутомерии, что является первым примером в ряду нафтазарина. Реакция диэфира **4** с водным NH₃ (22 C, 27ч) дала смесь аминопродуктов **15** (75%), **16** (13%) и **17** (6%). Обсуждаются механизмы образования всех продуктов **5–17**.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021).

- 1. Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Pokhilo N.D., Anufriev V.Ph., Denisenko V.A., Glazunov V.P. // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. N 9. P. 1390–1393.
- 2. Vasileva E.A., Mishchenko N.P., Zadorozhny P.A., Fedoreyev S.A. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11. P. 821–824.
 - 3. Arnone A., Merlini L., Nasini G., de Pava O.V. // Synth. Commun. 2007. V. 37. P. 2569–2577.
- 4. Мельман Г.И., Мищенко Н.П., Денисенко В.А., Бердышев Д.В., Глазунов В.П., Ануфриев В.Ф. // Журн. орган. химии. 2009. Т. 45. С. 44–50.
 - 5. Мельман Г.И., Денисенко В.А., Ануфриев В.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 2010. № 9. С. 1734–1738.
- 6. Борисова К.Л., Мельман Г.И., Денисенко В.А., Глазунов В.П., Ануфриев В.Ф. // Изв. АН. Сер. хим. 2012. № 3. С. 613–619.

Селективное О-метилирование триметилортоацетатом (поли)гидроксинафтазаринов – метаболитов морских ежей.III.

О.П. Шестак, Н.Н. Баланева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: shestak@piboc.dvo.ru

О-Метиловые эфиры гидроксизамещенных нафтазаринов синтезируются микроорганизмами, лишайниками, морскими беспозвоночными, высшими растениями и проявляют часто интересные биологические свойства [1]. Эти эфиры применяют также в синтезах многих природных полигидроксинафтазаринов.

Известен ряд реагентов для О-метилирования гидроксинафтазаринов, среди которых наиболее применим CH₂N₂. Все эти реагенты имеют те или другие недостатки [1].

На примере пигментов морских ежей **1**–**5** нами изучен потенциал триметилортоацетата $MeC(OMe)_3$ как заменителя CH_2N_2 в такого рода работах.

Ранее показано (см. сообщение II), что реакция $\mathbf{1}$ с избытком $HC(OEt)_3$ (т. кип. 0,5-1,0 ч) дает смесь дибензо[b,h]ксантентетраона и трис-(1,4-нафтохинонил)метана. В отличие от $HC(OEt)_3$ реакция $\mathbf{1}$ с избытком $MeC(OMe)_3$ (т. кип., 0.4 ч) дала Me-эфир $\mathbf{6}$ (выход 79%). Реакция момпаина $\mathbf{2}$ с $MeC(OMe)_3$ (т. кип., 0,5 ч) дала смесь моноэфира $\mathbf{7}$ (25%) и диэфира $\mathbf{8}$ (49%). Эта реакция может быть управляемой. При увеличении ее продолжительности до 1,5 ч выход $\mathbf{8}$ составил 78%. Если же эту реакцию проводили в смеси ортоэфира с 1,4-диоксаном (1:2 по объему, т. кип., 0,5 ч), то выход $\mathbf{7}$ достигал 70%.

Подобным образом можно управлять и реакциями MeC(OMe)₃ с пигментами 3–5. Так реакция 3 с избытком ортоэфира (т.кип., 0,5 ч) дала смесь 6-моноэфира 9 (63%), 2,6-диэфира 10 (20%) и 3,6-диэфира 11 (4%), а реакция 4– смесь 6-моноэфира 13 (60%) и 2,6-диэфира 14 (29%). Ни один из известных реагентов не позволяет осуществить селективное О-метилирование C(6)-ОН-группы пигментов 3 и 4. Исчерпывающее О-метилирование 4 происходит в более жестких условиях (160 C,5,0 ч,79%). Пигмент 5 в реакции с MeC(OMe)₃ (т. кип., 0,5 ч) дал намакохром 16 (59%) [2] и 2,6-диэфир 17 (31%). Увеличение времени реакции до 5 ч дало смесь эфиров 16–21, из которой выделены 2,7-диэфир 18 (15%) и 6,7-диэфир 19 (19%). Показано, что в работе [3] приведены ошибочные данные. Природными являются диэфиры 18 и 19, а не 17.

Триметилортоацетат – удобный и эффективный реагент как для избирательного, так и для исчерпывающего О-метилирования (поли)гидроксинафтазаринов.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021).

- 1. Баланева Н.Н., Шестак О.П., Новиков В.Л. // Изв. АН. Сер. хим. 2019. № 1. С. 55–63.
- 2. Mukai T. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1960. V. 33. P. 453-456.
- 3. Singh H., Moore R. E., Scheuer P. J. // Experientia. 1967. V. 23. P. 624–626.

Секция 2 Структура и свойства низкомолекулярных природных соединений

Сокультивирование как способ получения новых метаболитов морских грибов

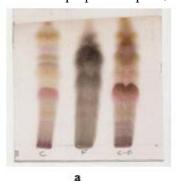
Е.Б. Белоусова, О.И. Журавлева, Ш.Ш. Афиятуллов

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: belousova.elena.99@mail.ru

Изучение морских грибов-микромицетов является новым и многообещающим направлением получения и синтеза различных метаболитов. Для расширения путей биосинтеза новых метаболитов разрабатываются различные пути, одним из которых является биотрансформация. Биотрансформация в микробной среде подразумевает под собой преобразование структур ранее выделяемых соединений или образование новых в результате изменения путей биосинтеза под воздействием внешних факторов (таких как добавление в среду роста дополнительных соединений, например, галогенидов, или сокультивирование). На сегодняшний день совместное культивирование морских грибовмикромицетов (как один из видов биотрансформации) является перспективным способом получения новых биоактивных вторичных метаболитов. В результате совместного культивирования предполагается увеличение выходов ранее выделенных биоактивных соединений, получение их производных, а также синтез новых метаболитов других химических классов.

Целью работы было провести сравнительный анализ этилацетатных экстрактов изолятов морских грибов *Aspergillus carneus* и *Isaria felina*, а также их сокультуры, с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС.

После инкубационного периода, мицелии индивидуальных и смешанных культур экстрагировали гексаном, EtOAc и BuOH. Для тестирования методом тонкослойной хроматографии (TCX) были отобраны три аликвоты (рис. 1). Первичный анализ показал разницу в метаболитном профиле образцов.



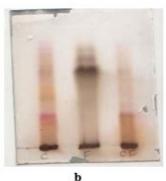


Рисунок 1. ТСХ на силикагеле, толуол – изопропанол 6:1, v/v (a) и силикагеле 60 RP-18 F254S, EtOH – H_2O 8:2 (b)

Для ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС анализов исследуемые фракции очищали методом колоночной хроматографии на стеклянной колонке с обратнофазным носителем YMC-Gel ODS-A, в качестве элюента использовали MeOH.

Далее, образцы были проанализированы методом обратнофазной ВЭЖХ на колонке Supelco Discovery C-18, с использованием градиента от 100% воды до 100% этанола за 60 минут и 100% этанола за 20 минут. Фракции анализировали с помощью УФ-детектора при двух длинах волн: 254 и 290 нм. Масс-спектрометрическое исследование фракций проводили методом ВЭЖХ-МС в режиме регистрации отрицательных ионов.

В соответствии с результатами ТСХ и ВЭЖХ сделаны следующие выводы: совместное культивирование грибов приводит к изменению метаболитного профиля в со-культуре, относительно исходных культур. Дальнейшее разделение этилацетатной фракции со-культуры *A. carneus* и *I. felina*, вероятно, приведет к выделению новых природных соединений.

Спектроскопия КД структурно нежестких природных соединений

Д.В. Бердышев

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: berdyshev@piboc.dvo.ru

Для ряда структурно-нежестких природных соединений (CitriperazineD[1], (6aR,11aR,3'R)-6a,11a-DihydrolespedezolA3 [2]) и нескольких модельных бициклических соединений изучено влияние движений с большими амплитудами смещений атомов из положения равновесия (LAM)на знаки и интенсивности полос в спектрах электронного кругового дихроизма (ECD). Центральным объектом исследований была структурная подвижность циклогексановых и фурановых циклов. Наши расчеты, выполненные методом B3LYP/cc-pvTz с учетом влияния растворителя по модели поляризуемого континуума (PCM), показали, что инверсия подобных циклов характеризуется очень пологим профилем сечения поверхности потенциальной энергии (ППЭ) вдоль LAM степени свободы. В ходе инверсии пятичленного фуранового цикла энергия основного электронного состояния меняется на величину $\Delta E \approx 3$ ккал/моль при изменениях двугранного угла $\Delta \theta_{furan} \approx \pm 40^\circ$. В молекулах, содержащих асимметрические центры, следствием такой структурной нежесткости становятся значительные вариации в форме ECD спектра. Так:

- интенсивности большинства полос меняются в несколько раз;
- знаки полос в диапазоне $250 \le \lambda \le 300$ нм зависят от знака и абсолютного значения двугранного угла θ_{furan} , характеризующего искажение фуранового цикла.

Изученные соединения содержат гидроксильные группы в разных циклах, которые совместно с ОН-группами протонодонорного растворителя (СН₃ОН) формируют водородносвязанные мостики. Наше исследование показало, что вследствие асимметрии рассмотренных природных соединений это ведет к стабилизации ряда их предпочтительных конформаций. Как следствие, растет вклад данных конформаций в суммарный контур ЕСD спектра.

Проведенное исследование показало, что учет влияния LAM-движений и прямое моделирование перестройки первой сольватной оболочки позволяет преодолеть недостатки стандартной теоретической модели, основанной на расчете вкладов в суммарный контур только от равновесных конфигураций. Стандартная модель часто не позволяет корректно описать экспериментальный ECD контур во всем доступном (с данным растворителем) диапазоне длин волн $195 \le \lambda \le 600$ нм.

Последний фактор оказывается важным для корректного решения структурных задач и позволяет более надежно устанавливать абсолютные конфигурации низкомолекулярных природных соединений.

- 1. Yurchenko A.N., Berdyshev D.V., Smetanina O.F., Ivanets E.V., Zhuravleva O.I., Rasin A.B., Khudyakova Y.V., Popov R.S., Dyshlovoy S.A., Amsberg G., Afiyatullov Sh. // Nat. Prod. Res. 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1552696.
- 2. Tarbeeva D.V., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Blagodatski A.S., Klimenko A.M., Kalinovskiy A.I., Grigorchuk V.P., Berdyshev D.V., Gorovoy P.G. // Fitoterapia. 2019. V. 135. P. 64–72.

Разработка лекарственных композиций на основе эхинохрома

Н.П. Мищенко, Е.А. Васильева, Д.В. Тарбеева, Е.В. Соколова, С.А. Федореев

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: vasilieva el an@mail.ru

Вторичные метаболиты, специфичные для морских ежей, известны как спинохромы или полигидроксинафтохиноидные пигменты. Наиболее распространенный пигмент морских ежей эхинохром А является действующим веществом антиоксидантного препарата Гистохром[®], производимого в России из морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, который используется в кардиологии и офтальмологии. Поскольку эхинохром А нерастворим в воде, гистохром доступен только в ампулах в форме ди- и тринатриевых солей эхинохрома для внутривенных инъекций или инфузий.

В последнее время появляется все больше публикаций, раскрывающих широкий спектр новых фармакологических активностей эхинохрома A. например, гастропротекторные гепатопротекторные антидиабетические [1],[2],[3],противоаллергические [4] митохондриально-защитные свойства И против кардиотоксических препаратов [5]. Поэтому представляет большой интерес разработка новых лекарственных форм на основе эхинохрома с различными компонентами, способными повысить его растворимость в воде, обеспечить целенаправленное и контролируемое высвобождение лекарственного средства, сохраняя или усиливая его фармакологические свойства для расширения пределов медицинского применения.

Совсем недавно нами была получена фармацевтическая композиция эхинохрома А (Эх) с другими известными антиоксидантами – аскорбиновой кислотой (Аск) и альфатокоферолом (Ток). Соотношение компонентов было выбрано на основании результатов метода ингибирования перекисного окисления липидов. Наиболее сильный антиоксидантный эффект продемонстрировал состав Эх-Аск-Ток 5: 5: 1 [6]. Мы установили, что эта композиция, содержащая вспомогательные компоненты, стабильна в течение 1 года и что добавление антиоксидантов и наполнителей не влияет на проницаемость эхинохрома А через искусственную мембрану, имитирующую желудочно-кишечный тракт (метод РАМРА).

Разработанная композиция проявила *in vitro* противовирусную активность в отношении РНК-содержащего вируса клещевого энцефалита и ДНК-содержащего вируса простого герпеса типа 1 [6]. Предлагаемая композиция антиоксидантов проявляет более сильные антиоксидантные и противовирусные свойства, чем эхинохром, открывая перспективы её медицинского применения в виде таблеток и капсул.

Работа выполнена в рамках темы государственной программы фундаментальных научных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-037).

- 1. Sayed D.A., Soliman A.M., Fahmy S.R. // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 107. P. 90–95.
- 2. Fahmy S.R. et al. // Braz. J. Biol. 2019. In press.
- 3. Mohamed A.S., Soliman A.M., Marie M.A.S. // Life Sci. 2016. V. 151. P. 41–49.
- 4. Itoh T. et al. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11. P. 1303–1306.
- 5. Jeong S. H. et al. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. P. 2922–2936.
- 6. Fedoreyev S. A. et al. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 509.

Сравнительная оценка антигерпетических свойств тиоглюкозидных производных природных полигидроксинафтохинонов

<u>О.В. Иунихина¹, Н.В. Крылова¹, Г.Г. Компанец¹, Ю.Е. Сабуцкий², С.Г. Полоник²</u>

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: olga iun@inbox.ru

По данным ВОЗ вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) инфицировано до 90% населения в мире. ВПГ-1 сохраняется в сенсорных ганглиях человека и активируется на фоне иммунодефицитных состояний организма. В настоящее время основным средством для лечения ВПГ-1 является ацикловир и его производные, длительное применение которых приводит к формированию резистентных штаммов ВПГ-1, поэтому разработка противовирусных лекарств является актуальной залачей. окислительный стресс, развивающийся в инфицированных вирусом клетках, способствует репликации возбудителя, снижению пролиферации клеток и их апоптозу. Недавно было показано, что природный пигмент морских ежей эхинохром проявляет противовирусные свойства, которые связывают с его антиоксидантной активностью [1]. С целью поиска новых противовирусных соединений – структурных аналогов эхинохрома конденсацией производными подходящими нафтазаринов c тиоглюкозидные конъюгаты гидроксинафтазаринов 3-6, которые обладали улучшенной растворимостью и антиоксидантной активностью [2].

работе ВПГ-1 представленной на модели выполнена оценка антигерпетических свойств тиоглюкозидных конъюгатов 3-6 в сравнении с эхинохромом и ацикловиром. Цитотоксическую и противовирусную активность определяли на культуре клеток Vero с помощью МТТ-теста. Противовирусную активность конъюгатов 3-6 оценивали по степени ингибирования цитопатического действия вируса (инфицирующая доза ВПГ-1 – 100 ТСІД₅₀/мл). Изучено 4 схемы оценки антигерпетического действия конъюгатов: 1) одновременное инфицирование клеток вирусом и обработка соединениями, 2) вирулицидное действие, 3) профилактическое действие, и 4) вирусингибирующее – обработка клеток веществами после инфицирования. Противовирусный эффект оценивался по 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}) и селективному индексу (SI). Показано, что конъюгаты 3-6 в 2 раза менее токсичны, чем эхинохром (CC₅₀ 318-477 µM, CC₅₀ 199.6 µM соответственно). При заражении клеток вирусом и обработкой их конъюгатами 3-6 (схема 1) наблюдали умеренный противовирусный эффект, наибольший для хинонов 5 и 6 (SI 1,9 и 1,7 соответственно), для эхинохрома (SI 0,8) ($p \le 0,05$). Наибольший эффект конъюгаты 3-6 показали при предварительной обработке вирусов (схема 2), где все вещества показали высокую активность, для тиоглюкозида 5 величина IC_{50} (86,2) была в два раза ниже, чем у эхинохрома (IC₅₀ 214,7), а значение SI 4,8 было в пять раз выше (SI 0,9). Наименьший 3–6 показали при профилактическом тиоглюкозиды вирусингибирующем (схема 4) применениях, где противовирусный эффект конъюгатов был наименьшим. Обсуждается связь противовирусного действия конъюгатов 3-6 с их антирадикальной активностью.

^{1.} Fedoreyev S.A., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Pislyagin E.A., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A., Ebralidze L. K., Leonova G.N. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 509.

^{2.} Polonik S.G., Krylova N.V., Kompanets G.G., Iunikhina O.V., Sabutski Y.E. // Nat. Prod. Commun. 2019. V. 14. N 6.DOI: 10.1177/1934578X19860672.

SPR-анализ белок-белковых взаимодействий цитохромов P450 с их редокс-партнёрами, модулируемых стероидными субстратами

<u>Л.А. Калужский</u>, Е.О. Яблоков 1 , П.В. Ершов 1 , Ю.В. Мезенцев 1 , А.М. Тумилович 2 , А.А. Гилеп 2 , С.А. Усанов 2 , А.С. Иванов 1

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь Электронная почта: la-kaluzhskiy@yandex.ru

Цитохромы семейства P450 монооксигеназ (CYP) выполняют в живых системах жизненно-важные функции, включая биосинтез холестерина, стероидных гормонов и окисление ксенобиотиков. Свои функции они выполняют в тесном взаимодействии с редокс-партнёрами: НАДФН-зависимой цитохром P450 редуктазой (CPR), цитохромом b5 (CYB5A) или адренодоксином (Adx), обеспечивающих перенос электронов, необходимых для функционирования СҮР.

Ранее, мы, с помощью оптических биосенсоров Biacore 3000 и T-200 (GE Healthcare, США), работающих на технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR), показали ингибирующий и стимулирующий эффекты биорегулятора изатина на аффинность комплексов СҮВ5А/СҮР3А4 [1] и СҮР5А1/СҮР2Е1 [2] соответственно. В продолжение работ влияния низкомолекулярных соединений аффинность изучению взаимодействия СҮР с их редокс-партнёрами, мы изучали влияние природных субстратов стероидной и нестероидной природы на аффинность комплексов между редокс-партнёрами (CYB5A, CPR, Adx) и микросомальными стероидогенными (CYP17A1, CYP21A2) цитохромами Р450 (с узкой субстратной специфичностью) и для сравнения СҮР2С19 (с широкой субстратной специфичностью). В работе использовались высокоочищенные белковые препараты (>95% по SDS ПААГ электрофорезу) полученные в ИБОХ НАН Беларуси, а в качестве субстратов СҮР использовали спиртовые растворы прогестерона (Р4), прегненолона (Р5), 17α-ОН прогестерона (17α-ОН Р4) и омепразола (нестероидное соединение, субстрат СҮР2С19).

Было показано, что присутствие в модельной системе стероидных субстратов приводило к изменению констант скорости образования и распада комплексов, и в результате, аффинности комлексов СҮР17А1/СҮВ5А и СҮР21А2/СҮВ5А, но не с СҮР/СРК или СҮР/Аdx. При этом присутствие P4, 17α-ОН P4, P5 приводило к увеличению аффинности взаимодействия СҮР17А1/СҮВ5А примерно на порядок, главным образом, изза увеличения константы скорости ассоциации комплексов, в то время как присутствие стероидных субстратов слабо влияло на аффинность комплексов СҮР21А2/СҮВ5А. Отсутствовало влияние стероидных субстратов и омепразола на аффинность комплексов СҮР2С19/СҮВ5А, а также СҮР2С19/СРК (Adx). Таким образом, нами были обнаружены специфичные эффекты «присутствия» субстратов по их влиянию на белок-белковые комплексы [3].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00071.

- 1. Ершов П.В., Яблоков Е.О., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Веселовский А.В., Гнеденко О.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С // Биомед. химия. 2017. Т. 63. № 2. С. 170–175.
- 2. Свирид А.В., Ершов П.В., Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Мезенцев Ю.В., Флоринская А.В., Сушко Т.А., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2017. Т. 9. № 4 (35). С. 96–105.
- 3. Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S. // J. SteroidBiochem. Mol. Biol. 2019. V. 187. P. 124–129.

Влияние полифенолов из растения Ampelopsis japonica на Wnt каскад

<u>А.М. Клименко¹</u>, Д.В. Тарбеева², А.С. Благодатский¹, С.А. Федореев²

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: klimenkotonya.vl@mail.ru

Сигнальный путь Wnt играет ключевую роль в эмбриональном развитии всех многоклеточных животных, включая человека. Во взрослом состоянии он отвечает за пролиферацию стволовых клеток и регенерационные процессы. Избыточная активация сигнального пути Wnt в тканях взрослого организма может привести к увеличению пролиферации клеток и канцерогенезу. Наиболее быстро прогрессирующий тип рака молочной железы, так называемый «трижды отрицательный» связан с повышенной экспрессией компонентов сигнального пути Wnt. Трижды отрицательный рак молочной железы не поддаётся существующим методам целенаправленной противоопухолевой терапии, основанной на избирательном ингибировании эстрогеновых и прогестероновых рецепторов или рецептора Her-2, что делает его самой опасной формой опухоли.

Внутриклеточный сигнальный Wnt является одной из потенциальных «мишеней» воздействия на клетки трижды отрицательного рака молочной железы. Компоненты Wnt каскада дают множество потенциальных мишеней для ингибирования этого сигнального пути Wnt и подавления пролиферации Wnt-зависимых опухолевых клеток [1]. Поэтому задача поиска природных ингибиторов Wnt и установление «мишеней» их действия имеет большое практическое значение.

Нами были проведены эксперименты по определению уровня Wnt-каскада, на котором находится «мишень» действия экстракта *А. japonica*, на Wnt каскад. Было проверено их влияние на стабилизацию β-катенина – белка эффектора Wnt-каскада. Для этого мышиные фибробласты, продуцирующие белок Wnt3a, активирующий Wnt каскад, инкубировали с экстрактом корней *А. japonica* в концентрации 100 и 50 нг/мкл в течение 24 ч. Разделение белков клеточного лизата было проведено методом электрофореза в полиакриламидном геле. Содержание β-катенина относительно тубулина определяли методом иммуноблоттинга. Обнаружено, что экстракт корней *А. japonica* снижает количество β-катенина в цитоплазме фибробластов мыши, активированных белком Wnt3a, что свидетельствует о расположении мишени его действия на уровнях каскада более высоких, чем β-катенин, например, взаимодействие рецептора с лигандом или β-катенин-разрушающий комплекс. Методом ВЭЖХ-МС показано, что в активном экстракте корней *А. japonica* содержались следующие соединения: галловая кислота (1), эпикатехин (2), эпикатехингаллат (3), эпигаллокатехингаллат (4) и резвератрол (5).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00502 мол а

1. Blagodatski A., Poteryaev D., Katanaev V. // Mol. CellTher. 2014. V. 2. P. 28.

Поликетиды морских грибов как нейропротекторные соединения

Е.С. Менчинская, Е.А. Пислягин, А.Н. Юрченко, Е.А. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: ekaterinamenchinskaya@gmail.com

Нивеоглауцин A (1), флавоглауцин (2), тетрагидроауроглауцин (3) и изодигидроауроглауцин (4) были выделены ранее из гриба Aspergillus niveoglaucus (Южно-Китайское море, Вьетнам) [1]. Было показано, что соединения 2-4 проявляют радикалсвязывающую активность в тесте с DPPH [2,3]. Целью данной работы было исследование нейропротекторного действия этих метаболитов морских грибов поликетидной природы.

Для изучения нейропротекторной активности использовали клетки мышиной нейробластомы Neuro-2a. Вещество **3** показало умеренно-токсический эффект в отношении этих клеток (IC_{50} 87.2 μ M), остальные исследуемые соединения были не токсичны до 100 μ M. В связи с этим дальнейшие исследования проводили при концентрации веществ 10 μ M.

Мы исследовали эффекты веществ **1-4** в моделях болезни Паркинсона, вызванных 6-гидроксидофамином (6-OHDA) и паракватом *in vitro*. Обработка клеток нейробластомы нейротоксином 6-OHDA приводила к увеличению уровня активных форм кислорода (АФК) на 40% по сравнению с контрольными клетками, но все соединения предотвращали развитие этого эффекта. Однако только нивеоглауцин A (1) и флавоглауцин (2) повышали жизнеспособность 6-OHDA-обработанных клеток на 20-25%. Нейропротекторный эффект нивеоглауцина A (1) проявлялся как в случае добавления вещества к клеткам за 1 ч до нейротоксина, так и в том случае, когда вещество добавляли через 1 ч после добавления 6-OHDA. Флавоглауцин (2) был эффективнее в том случае, когда его добавляли к клеткам за 1 ч до добавления 6-OHDA. Примечательно, что нейропротекторная активность флавоглауцина (2) была более выраженной по сравнению с 1. В модели болезни Паркинсона, вызванной паракватом, все соединения были неактивны. Это говорит в пользу антиоксидантного механизма нейропротекторного действия изученных поликетидов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 18-34-00737 и 18-34-00621).

- 1. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Ivanets E.V., Trinh P.T.H., Ngoc N.T.D., Zhuravleva O.I. et al. // Nat. Prod. Res. 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1547293. In press.
- 2. Li Y., Li X., Lee U., Jung S.K., Hong D.C., Byeng W.S. // Chem. Pharm. Bull. 2006. V. 54. N 6. P. 882–883.
- 3. Miyake Y., Ito C., Kimura T., Suzuki A., Nishida Y., Itoigawa M. // Food Sci. Tech. Res. 2014. V. 20. N 1. P. 139–146.

Нейропротекторная активность (+)-криптоэхинулина В и его аналогов

Е.А. Пислягин, Е.С. Менчинская, Е.В. Иванец, Е.А. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: pislyagin@hotmail.com

Болезнь Паркинсона – это хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга, одна из наиболее распространенных нейродегенеративных болезней человека [1].

Многие грибы родов *Aspergillus* и *Eurotium* продуцируют эхинулин-подобные индолдикетопиперазиновые алкалоиды. Для одного из них, неоэхинулина A, была показана антиоксидантная и нейропротекторная активности [2]. В нашей работе была исследована нейропротекторная активность стереоизомеров (+)- и (–)-криптоэхинулинов В (1a и 1b) и других эхинулин-подобных алкалоидов 2-7, выделенных из морского гриба *Aspergillus niveoglaucus*.

(+)-Криптохинулин В (1a) увеличивал жизнеспособность клеток Neuro2a в моделях болезни Паркинсона, вызванной 6-гидроксидофамином (6-OHDA) и паракватом на 21.6% и 40.7% соответственно. При этом (+)-криптоэхинулин В (1a) снижал уровень активных форм кислорода $(A\Phi K)$ только в клетках, инкубированных с паракватом.

Его стереоизомер (–)-криптоэхинулин В (1b) был активен только в модели, вызванной паракватом, также как и неоэхинулины С (5) и Е (6). Неоэхинулин (7) был активен только в (6)-ОНDA-индуцированной модели.

Ранее изучение взаимосвязи структура-активность неоэхинулина А и его производных привело к выводу, что двойная связь С-8/С-9, составляющая конъюгатную систему с индольным и дикетопиперазиновым фрагментами неоехинулина А, важна для антиоксидантной активности [2]. Наше исследование соединений 1-7 подтвердило это предположение. Влияние пренильного заместителя на нейропротекторную активность криптоэхинулинов 1 и 2 и неоэхинулинов 4-7 различается и не позволяет сделать однозначного вывода о его вкладе. Полученные данные не позволяют сделать однозначный вывод о влиянии пренильного заместителя на нейропротекторную активность криптоэхинулинов 1 и 2 и неоэхинулинов 4-7.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 18-34-00737 и 18-34-00621).

- 1. Levin O.S., et al. // Parkinson's disease. M. 2006. 256 p.
- 2. Kimoto K, et al. // J. Antibiot. 2007. V. 60. P. 614–621

Антирадикальная активность природных полигидрокси-, аминогидроксинафазаринов и родственных синтетических аналогов

Н.С. Полоник 1 , Ю.Е. Сабуцкий 2 , С.Г. Полоник 2

¹Тихоокеанский институт океанологии им. В.И. Ильичева ДВО АН, Владивосток ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: sergpol@piboc.dvo.ru

Полигидроксилированные производные нафтазарина (5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинона) являются уникальной группой природных хиноидных соединений, выделенных из морских объектов. На основе наиболее доступного пигмента морских ежей эхинохрома в ТИБОХ ДВО РАН создан лекарственный препарат Гистохром®, применяющийся для лечения ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, травм и ожогов глаз [1]. В настоящее время активно изучаются как различные аспекты медицинского применения гистохрома, так и механизмы его действия. Установлено, что высокая биологическая активность эхинохрома связана с его антиоксидантными свойствами [2]. Недавно из морских ежей были выделены новые производные нафтазарина с аминогруппами в β-положении нафтазаринового ядра [3,4].

Антиоксидантные свойства полигидроксилированных нафтазаринов и их производных ранее изучались [5], однако сопоставительные исследования по влиянию структуры нафтохинонов на антирадикальную активность в группах полигидрокси- и аминогидроксинафтазаринов до настоящего времени отсутствовали. Ранее мы разработали удобный метод синтеза и получили серию новых аминогидроксинафтазаринов [6,7]. Используя нашу коллекцию из 50 природных и синтетических полигидроксинафтохинонов, и вновь синтезированных нами аминогидроксинафтазаринов, методом ABTS мы исследовали их антирадикальную активность и установили основные корреляции между строением соединений и их антиоксидантной активностью [8].

 R^1 , $R^2 = H$, Me, Et, Cl, OH, MeO, EtO, μ -PrO, μ -BuO, μ -AmylO

Было показано, что в обеих группах исследованных соединений нафтазарины более активнычем соответствующие производные 1,4-нафтохинона и юглона (5-гидрокси-1,4-нафтохинона). Природные аминонафтазарины (спинамин Е, эхинамин А) и полигидроксилированные нафтазарины (спиназарин, эхинохром, спинохромы Д и Е) показали наивысшие антирадикальные свойства. Для большинства соединений наличие в ароматической части нафтазарина *О*-алкоксильного заместителя с длинной цепью усиливает антирадикальную активность нафтохинона.

- 1. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Багирова В.Л. // Хим.-фарм. журн. 2003.Т. 37. С. 49–53.
- 2. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O. // Life Sci. 2005. V. 76. P. 863–875.
- 3. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Pokhilo N.D., Anufriev V.Ph., Denisenko V.A., Glazunov V.P. // J. Nat. Prod. 2005.V. 68. P. 1390–1393.
- 4. Vasileva E.A., Mischenko N.P., Zadorozhny P.A., Fedoreyev S.A. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11. P. 821–824.
 - 5. Utkina N.K., Pokhilo N.D. // Nat. Prod. Commun. 2012, V. 7. P. 901–904.
 - 6. Polonik N.S., Polonik S.G., Denisenko V.A., Moiseenko O.P. // Synthesis. 2011. P. 3350–3358.
 - 7. Sabutskii Yu.E., Denisenko V.A., Polonik S.G. // Synthesis. 2018, V. 50. P. 3738–3748.
 - 8. Polonik N.S., Sabutskii Yu.E., Polonik S.G. // Nat. Prod. Commun. 2018. V. 13.P.1319–1322.

Биологически активные полифенолы растения Lespedeza bicolor

Д.В. Тарбеева, С.А. Федореев, М.В. Веселова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток Электронная почта: tarbeeva1988@mail.ru

Некоторые виды рода Lespedeza биосинтезируют биологически полифенолы, в состав которых входят пренилированные флавоноиды, а также флавононы и их гликозиды [1]. Ранее мы сообщали о выделении из коры стеблей L. bicolor пяти пренилированных птерокарпанов и одного стильбеноида [2]. Мы продолжили изучение химического состава полифенольных соединений коры стеблей L. bicolor и их биологической активности. Последовательной колоночной хроматографией на полиамиде, силикагеле и сорбенте с обращенной фазой C-18 из коры стеблей L. bicolor были выделены флаваноны эриодиктиол (1), 7-O- β -D-глюкопиранозид эриодиктиола (2) и 7-O- β -Dглюкопиранозид нарингенина (3). Структуры выделенных соединений были установлены методами ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. 7-*O*-β-D-глюкопиранозид эриодиктиола (2) и 7-О-β-D-глюкопиранозид нарингенина (3) ранее не были обнаружены в экстрактах L. bicolor.

На модели взаимодействия с ДФПГ радикалом была оценена антирадикальная активность соединений 1-3. ИК $_{50}$ рассчитывали как минимальную концентрацию исследуемых соединений, необходимую для улавливания 50% радикалов ДФПГ. Была определена железовосстанавливающая активность выделенных полифенолов (табл. 1). 7-О- β -D-глюкопиранозид эриодиктиола (2) и эриодиктиол (1) проявили одинаковую антирадикальную и железовосстанавливающую активности. Однако показатели антиоксидантной активности этих соединений были ниже, чем у препарата сравнения кверцетина. Активность 7-O- β -D-глюкопиранозида нарингенина (3) была значительно более низкой по сравнению с флаванонами 1 и 2, что обусловлено отсутствием гидроксильной группы при C-3 кольца B в этом соединении.

Таблица 1 — Антирадикальная и железовосстанавливающая активность полифенолов **1-3**.

	Антирадикальная активность, ИК50	Железовосстанавливающая активность, $C(Fe^{2+}, MKMOJE)/C(ИССЛЕДУМОЕ ВЕЩЕСТВО, MKMOJE)$
Кверцетин	15.1±2.0	4.0±0.1
Аскорбиновая кислота	30.1±2.5	2.0±0.3
1	38.4±2.2	1.0±0.1
2	34.3±1.9	0.9±0.1
3	202.3±16	0.5 ± 0.1

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00502 мол а

- 1. Woo H.S., Kim D.W., Curtis-Long M.J., Lee B.W., Lee J.H., Kim J.Y., Kang J.E., Park K.H. # Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. V. 21. P. 6100–6103.
- 2. Tarbeeva D.V., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Blagodatski A.S., Klimenko A.M, Kalinovskiy A.I., Grigorchuk V.P., Berdyshev D.V., Gorovoy P.G. // Fitoterapia. 2019. V. 135. P. 64-72.

Секция 3 Биополимерные природные соединения

Наноразмерный арабиногалактан лиственницы - перспективный полимерный редокс-носитель для наночастиц биогенных металлов

Г.П. Александрова, Б.Г. Сухов

Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск Электронная почта:alexa@irioch.irk.ru

Химия биомедицинских полимеров связана с исследованием и модификацией полимерных соединений, проявляющих определенную биологическую активность. Одним из решений проблемы создания новых материалов медико-биологического назначения – перспективных носителей фармакофоров с адресной доставкой, иммуномодуляторов и биосенсоров с управляемыми свойствами – является? осуществленный авторами молекулярный дизайн биосовместимых нанокомпозитов с редокс-активной стабилизирующей полисахаридной матрицей. Биологическая активность, в том числе иммуномодуляторная, обусловлена в значительной мере мембранотропными свойствами арабиногалактана [1].

Мы конкретизировали строение арабиногалактана лиственницы сибирской (Larix sibirica), произрастающей в восточных областях России. Существование ассоциатов макромолекул арабиногалактана, имеющего гиперразветвленное строение, очевидно, находит свое выражение в том, что на микрофотографиях арабиногалактан представлен в форме сфероидов, размеры которых составляют 0,2-10 мкм [2]. Арабиногалактан обладает очень узким молекулярно-массовым распределением мономодального типа, близким по Данные, полученные с помощью ТЭМ после форме к гауссовой кривой [3]. контрастирования макромолекул уранилацетатом, позволяют классифицировать полисахарид как наноразмерный [4]. Аналогичные наноразмерные структуры наблюдали и для других полисахаридов, в частности хитозана и гидролизатов целлюлозы. Соответствие подобных структур реальным размерам полисахарида подтверждает показанное в работе [5] образование в водном растворе конгломератов молекул арабиногалактана с размерами 11 – 200 нм. Нами разработана стратегия осуществления направленного экологически безопасного синтеза нанобиокомпозитов с необычным комплексом магнитных, оптических, каталитических И биологически активных свойств Водорастворимость, наличие галактозных звеньев макромолекуле арабиногалактана, его доказанная мембранотропность позволяет предположить, что OH, образуя межмолекулярные комплексы типа гость-хозяин между наночастицами и полисахаридной молекулой, придает гидрофильные свойства формирующимся во взаимосвязи с нею наночастицам благородных и переходных металлов и при взаимодействии с организмами значительно увеличивает их биодоступность [1,6]. Таким образом, арабиногалактан представляет собой уникальный природный наноразмерный полисахарид, имеющий значительный потенциал при создании технических И медико-биологических наноструктурированных многофункционального назначения.

- 1. Дубровина В.И., Витязева С.А., Коновалова Ж.А., Юрьева О.В., Старовойтова Т.П., Войткова В.В., Александрова Г.П., Половинкина В.С., Иммуномодулирующее действие металлосодержащих нанокомпозитов. Иркутск: Мегапринт. 2017. 77 с.
- 2. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Фадеева Т.В., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. // Нанотехника. 2010. № 3 (23). С. 34-42.
- 3. Александрова Г.П., Боймирзаев А.С., Лесничая М.В., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. // Журнал общей химии. 2015. Т. 85, № 2. С. 317-326.
- 4. Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. //Nanostructures in polysaccharides: formation, structure, properties, application. 2008. С. 41-45.
 - 5. Gasilova E.R., Aleksandrova G.P. // J. Phys. Chem., C. 2011. V. 115, 50. C. 24627-35.
 - 6. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А., и др. // ЖСХ. 2007. Т. 48, № 5. С. 979-984.

Влияние температуры культивирования на свойства телец включения мембранной фосфолипазы A_1 Yersinia pseudotuberculosis

С.И. Бахолдина, А.М. Стенкова, Н.Ю. Чернышова, Е.В. Сидорин, Н.Ю. Ким, Е.А. Менчинская, Т.Ю. Горпенченко, Д.Л. Аминин, Т.Ф. Соловьева Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: sibakh@mail.ru

Многие мембранные белки, которые экспрессируются в *Escherichia coli*, накапливаются в цитоплазме бактерий в виде нерастворимых агрегатов, т.н. телец включения (ТВ). Недавними исследованиями установлено, что ТВ могут содержать белок в конформации, которая подобна нативной. Такие «неклассические» ТВ весьма привлекательны как для получения активного целевого белка, так и использования их в качестве наноматериалов в биотехнологии и медицине. Образование подобных ТВ зависит как от природы белка, так и от целого ряда факторов, влияющих на биосинтез рекомбинантного белка, включая условия роста штамма-продуцента.

Целью данного исследования является поиск условий экспрессии в $E.\ coli$ мембранной фосфолипазы A_1 (PldA) $Y.\ pseudotuberculosis$, которые приводят к получению TB, состоящих преимущественно из корректно свернутого рекомбинантного белка. Было изучено влияние температуры на свойства и структурные характеристики TB. В качестве репортера фолдинга PldA был использован зеленый флуоресцентный белок (GFP). В экспрессионной плазмиде последовательности PldA и GFP были соединены таким образом, что образование хромофора было возможно только при правильном сворачивании целевого белка.

Максимальная флуоресценция наблюдалась в *E. coli*, выращенных при 18°C, тогда как в бактериях, культивируемых при 26°C, она падает почти в 4 раза, а при 37°C практически находится на уровне бесплазмидных клеток. Следовательно, понижение температуры роста способствует корректному сворачиванию рекомбинантного белка. С помощью флуоресцентной микроскопии показано, что химерный белок накапливается в клетках в виде ТВ.

ТВ химерного белка, синтезированные при 18 °С, имеют сферическую форму и гидродинамический радиус (Rh) 400-500 нм. Они являются довольно рыхлыми и непрочными, что характерно для ТВ с высоким содержанием белка в конформации, близкой к нативной. При длительной инкубации в PBS и при низких концентрациях в дисперсиях они частично дезагрегируют с образованием частиц с Rh 342, 298, 260 (около 80%) и 65 нм (15-22% по объему). Полученные ТВ практически полностью дезагрегируют в 0,03% SDS, при этом интенсивность флуоресценции химерного белка сохраняется на уровне 47%, указывая на то, что часть солюбилизированного из ТВ белка сохраняет близкую к нативной конформацию. Этот процесс сопровождается частичной денатурацией белка: содержание α-структуры увеличивается на 17,3% за счет уменьшения содержания β-структуры. ТВ PldA-GFP не токсичны для эукариотических клеток и по данным конфокальной микроскопии обладают свойством проникать в клетки нейробластомы.

Таким образом, пониженная температура культивирования позволяет получить мало стабильные ТВ с относительно высоким содержанием корректно свернутого рекомбинантного белка, который может быть солюбилизирован с сохранением близкой к нативной конформации.

Химическая модификация ламинаранов бурых водорослей

Е.В. Гетман, О.С. Маляренко, Р.В. Усольцева, С.П. Ермакова

Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток Электронная почта: getman_ev_piboc@mail.ru

Ламинараны – это нейтральные, водорастворимые полисахариды бурых водорослей, построенные из остатков бета-D-глюкозы, соединенных 1,3- или 1,3- и 1,6-О-гликозидными связями. Степень полимеризации данных полисахаридов составляет 20–40, что соответствует интервалу молекулярных масс 3–6 кДа [1]. Ламинараны обладают комплексной биологической активностью (иммуномодулирующей, противоопухолевой и радиопротекторной) [2].

Известно, что производные ламинаранов, полученные путем химической или ферментативной трансформации, имеют более выраженное биологическое действие, чем нативные ламинараны, выделенные из бурых водорослей [3, 4]. Большинство ламинаранов бурых водорослей, равно как и их производные, остаются неизученными с точки зрения биологической активности, что представляет собой незаполненную нишу в теоретических познаниях и скрывает в себе потенциал получения целого ряда препаратов с широким спектром биологической активности.

Цель исследования – химическая модификация ламинарана из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* и определение структурных характеристик полученных соединений.

Химическая модификация ламинарана была проведена с использованием метода сульфатирования (реакция с комплексом триоксид серы-диметилфорамида в безводной среде) и аминирования (реакция присоединения аминогрупп к эпоксиактивированным ламинаранам).

Структурные характеристики были определены с помощью химических (определение содержания общих и восстанавливающих сахаров, сульфатных групп и аминогрупп) и физико-химических методов анализа (ИК-спектроскопия, одно- и двумерная спектроскопия ЯМР).

Определено, что степень сульфатирования производных ламинарана из $S.\ cichorioides$ составляет 42%, а степень аминирования — 32%. В 13 С ЯМР спектре сульфатированного ламинарана наблюдается сдвиг части сигналов C2, C4 и C6 в слабое поле, что свидетельствует о частичном сульфатировании ламинарана по данным положениям. В 13 С ЯМР спектре аминированного ламинарана наблюдается сдвиг части сигналов C6 в слабое поле, а также появление некоторых новых сигналов, соответствующих наличию группы $-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH_2$ при C6 некоторых остатков глюкозы в молекуле.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН № 18-4-010.

- 1. Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1994. V. 20. Р. 1349–1358.
- 2. Raposo M.F., Morais A.B., Morais R.M. // Mar. Drugs 2015. V. 13. P. 2967–3028.
- 3. Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A., Isakov V.V. // Bioorgan. Khim. 1995. V. 21. P. 218-225.
- 4. Huang G., Chen X., Huang H. // Curr. DrugTargets. 2016. V. 17. P. 1799–1803.

Секвенирование и сравнительный анализ генома Vibrio sp. CB1-14

К.В. Гузев, Н.Ю. Чернышева, В.В. Куриленко, М.П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: lmb@piboc.dvo.ru

беспозвоночные Морские являются богатым источником различных гуанидинсодержащих природных соединений, обладающих противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми и противоопухолевыми свойствами. Ряд вторичных метаболитов, выделенных из морских губок и асцидий, имеет микробное происхождение [1]. Недавно из слизи ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus* variopedatus (тип Annelida) был выделен гуанидиновый алкалоид 6-эпи-монанхорин, обладающий цитостатической активностью [2]. Морские бактерии, изолированные из этой слизи, в основном принадлежали роду Vibrio, среди которых особый интерес представил штамм *Vibrio* sp. CB1-14 – продуцент 6-эпи-монанхорина [3].

Нами был секвенирован геном морской бактерии *Vibrio* sp. CB1-14. Черновой геном был получен с использованием технологий пиросеквенирования на анализаторе GS Junior (454/Roche, Швейцария) и полупроводникового секвенирования на платформе Ion Torrent IonS5 XL (Thermo Fisher Scientific, США). Сборка прочтений *de novo* осуществлена в контиги с помощью SPAdes 3, аннотация полученного чернового генома выполнена на сервере RAST. Мультилокусное типирование и филогенетический анализ были выполнены с помощью программного обеспечения MEGA 7 и SplitsTree 4.

Геном СВ1-14 был собран в 124 контига с N50 равным 222,473 п.н., размер генома был оценен в 5,466,975 п.н. и 46.04 % ГЦ-состава. Филогенетическая реконструкция девяти генов «домашнего хозяйства», выполненная для 25 типовых штаммов рода Vibrio, показала, что штамм Vibrio sp.CB1-14 возможно образует новый вид рода Vibrio.

Изучение генома *Vibrio* sp. CB1-14 открывает возможности для идентификации генного кластера биосинтеза гуанидинового алкалоида 6-эпи-монанхорина и представляет фундаментальный (понимание биосинтеза метаболита) и практический (биотехнологическое получение соединений подобного класса) интерес.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 17-14-01065.

- 1. Lo Giudice A., Rizzo C. // Diversity (Basel). 2018. V. 10. N 3. P. 80.
- 2. Shubina L.K., Makarieva T.N., Denisenko V.A., et al. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11, N 9. P. 1253–1257.
 - 3. Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., et al. // Mar. Drugs. 2019. V. 17, N 4. P. 213.

Поликонденсация предшественников диоксида кремния и титана на матрицах из природных и синтетических полимеров

<u>А.И. Дегтяренко¹</u>, Ю.Н. Шкрыль¹, Т.В. Авраменко¹, Т.Ю. Горпенченко¹, С.С. Вознесенкский²

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток

²Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: 77sat7@gmail.com

Биополимеризация водорастворимых силикатов используется для построения сложных скелетов организмами из двух отдалённых таксонов — диатомеями и губками. Специализированные белки — силикатеины — направляют формирование упорядоченных кремниевых структур на нано- и микрометровом масштабе, создавая конструкции, обладающие выдающимися физическими характеристиками. Особенностью этих биокаталитически активных макромолекул является наличие каталитической триады аминокислот с высоким содержанием катионных функциональных групп. Природные силикатеины синтезируются в специализированных клетках губок в малых количествах и их выделение затруднено, что делает актуальным поиск синтетических полимеров, способных выполнять аналогичную функцию [1].

Наночастицы диоксида кремния эффективны в качестве опорных структур для новых полимерных трансплантов [2], могут быть использованы в роли инертной матрицы для катализаторов [3] и в системах контролируемого высвобождения биологически активных молекул[4]. Так же наночастицы из оксида кремния и, особенно, оксида титана используются в прототипах новейших оптических компонентов биосенсоров.

Нами исследована возможность формирования кремниевых наноструктур на природных и синтетических полимерных матрицах, при использовании как традиционных, так и новых предшественников диоксидов кремния и титана.

Такие коммерчески доступные белки как бычий сывороточный альбумин (BSA), пероксидаза хрена (HRP) и миоглобин (Mb) не показали каталитической активности в отношении поликонденсации ни водорастворимых прекурсоров – тетракис(2-гидроксиэтил) ортосиликата (THEOS) и Na_2SiO_3 , ни предшественника титана – титанбис(аммонийлактат) дигидроксида (TiBALDH). В присутствии же силикатеина LoSilA1 морской губки *Latrunculia oparinae*, THEOS формирует кристаллические структуры. THEOS, Na_2SiO_3 и TiBALDH образуют агрегаты, состоящие из множества сферических зёрен диаметром ~ 10 нм при длительной инкубации с растворами полиэтилениминов, однако полилизины катализируют поликонденсацию с большей эффективностью.

Использование алкоксидов кремния, таких как THEOS, в качестве прекурсоров ограничено ввиду денатурирующей активности продуктов их гидролиза, спиртов, в отношении ферментов. Чтобы обойти это ограничение мы синтезировали глицериновые производные тетраэтилсиликата — тетраглицеролсилан (TGS), триглицеролметилсилан (TGMS) и триглицеролвинилсилан (TGVS). BSA, HRP и Мb не катализируют поликонденсацию новых предшественников. В присутствии LoSilA1 TGMS и TGVS формируют правильные сферические структуры до 3 мкм, а TGS— неправильных агрегаты. В присутствии катионных полимеров эти соединения так же конденсируются с образованием структур различной морфологии и размера, а добавление TGVS к раствору полиэтиленимина приводит к формированию относительно гладких и крупных сфер диаметром до 800 нм. Полученные результаты свидетельствует о схожих деталях процесса реакции поликонденсации, катализируемой природными и синтетическими полимерами.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН № 18-3-045.

- 1. Satoko M., Ryuichi S., Mitsuru J., Hisao K. // ChemBioChem. 2007. V. 8. P. 1729 1735.
- 2. Jukka N., Mikko K., Teemu R., Heikki T. // Polym. Chem. 2011. V. 2. P. 2027–2036.
- 3. Yanwu Z., Zhibin Y. // Macromolecules. 2008. V. 41. P. 6331–6338.
- 4. Meng H., Xue M., Xia T., Zhao Y., Tamanoi F., Stoddart J.F., Zink J.I., Nel A.E. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P.12690–12697.

Изучение некоторых каталитических свойств рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии Wenyingzhuangia fucanilytica CZ1127^T

А.О. Зуева, А.С. Сильченко, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: zstasya95@gmail.com

Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей — были обнаружены более ста лет назад [1], однако все еще привлекают внимание исследователей всего мира. Эти полисахариды имеют большой потенциал для применения в медицине и фармакологии, поскольку обладают широким спектром терапевтических свойств [2]. Недавно стало известно о возможности использования фукоиданов в качестве агентов при адресной доставке лекарственных препаратов, что открывает новые перспективы в борьбе с онкологическими заболеваниями [3].

Несмотря на прогресс в изучении физиологических свойств фукоиданов, возникают трудности в стандартизации и установлении их сложных многообразных структур, что зачастую делает невозможным определить связь между структурой полисахарида и проявлением той или иной биологической активности. Существующие химические методы установления структуры углеводов не всегда позволяют достичь удовлетворительных результатов. Решение проблемы становится возможным при использовании ферментов – фукоиданаз, способных катализировать расщепление гликозидных связей между сульфатированными остатками фукозы в сложных молекулах фукоидана на короткие фрагменты. Только биохимически охарактеризованные ферменты с известными типом действия, оптимальными условиями проявления активности и специфичностью подходят для использования в качестве инструментов при определении структур сложных полисахаридов. Однако на сегодняшний день только одна фукоиданаза полностью биохимически охарактеризована [4].

В данной работе мы описываем предварительные данные о биохимических характеристиках рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии Wenyingzhuangia fucanilytica CZ1127^T. Был проанализирован геном морской бактерии W. fucanilytica, идентифицированы четыре гена, гипотетически кодирующие фукоиданазы (fwf1, fwf2, fwf3 и fwf4). Для подтверждения их функций были клонированы гены фукоиданаз и в клетках Escherichia coli продуцированы рекомбинантные белки. Фукоиданазы FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 были выделены и очищены. Все полученные ферменты катализировали гидролиз фукоиданов. Для фукоиданаз FWf1 и FWf2 были изучены оптимальные условия прохождения эффективного ферментативного катализа. Установлено влияние pH, температуры и растворов солей металлов на активность фукоиданаз. Изучение кинетики ферментативного гидролиза фукоидана с помощью FWF1 и FWF2 позволило определить тип действия этих ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18-04-00905).

- 1. Kylin H. // Zeitschrift für Physikalische Chemie. 1913. №83. P. 171–197.
- 2. Senthilkumar K., Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S.K. // Int. J. Biol. Macromol. 2013. V. 60. P. 366–374.
- 3. Lu K.-Y., Li R., Hsu C.H., Lin C.W., Chou S.C., Tsai M.L., Mi F.L. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 165. P. 410-420.
- 4. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R.V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N. // Glycobiology. 2017. Book 27. N 3. P. 254–263.

Структурная характеристика липида A морской грамотрицательной бактерии $Marinicella\ literalis\ KMM\ 3900^T$

<u>И.Н. Лизанов¹</u>, М.С. Кокоулин², Л.А. Романенко²

 1 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 2 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: lizanov_in@students.dvfu.ru

Одной из важнейших проблем современной медицины является септический шок. Несмотря на разработку антибиотиков последнего поколения, смертность от септического шока, вызванного грамотрицательными бактериями (эндотоксический шок), остается высокой. Одним из направлений в борьбе с эндотоксическим шоком является блокирование эндотоксина (липополисахарида, ЛПС) в местах его клеточной рецепции. Полученные к настоящему моменту результаты показывают, что некоторые ЛПС морских отличаются грамотрицательных бактерий низкой токсичностью тонклакосп антагонистические свойства по отношению к ЛПС патогенных микроорганизмов. Хорошо известно, что за эндотоксические свойства молекулы ЛПС отвечает липид А. В связи с этим, нами была охарактеризована структура липида А морской грамотрицательной бактерии *Marinicella litoralis* KMM 3900^T.

ЛПС был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом. Деградацию ЛПС проводили мягким кислотным гидролизом с последующей экстракцией липидной компоненты. Анализ состава жирных кислот липида А методом ГЖХ-МС в виде их метиловых эфиров показал наличие в качестве основных остатков 3-гидроксиундекановой и ундекановой кислот. Моносахаридный анализ липида А методом ГЖХ в виде ацетилированных полиолов и (S)-2-октил гликозидов выявил присутствие остатков D-глюкозамина и D-маннозы. Липид А был изучен с помощью метода массспектрометрии (ИЭР и МАЛДИ) и было показано, что он представляет собой смесь гексапента- и тетра-ацилированных изоформ, несущих одну или две фосфатных группы в канонических положениях. На основании данных МС/МС анализа, было установлено, что микроорганизм *М. litoralis* КММ 3900^Т продуцирует ЛПС с двумя структурно отличными типами липида А, наиболее полные структуры которых изображены на рисунке 1.

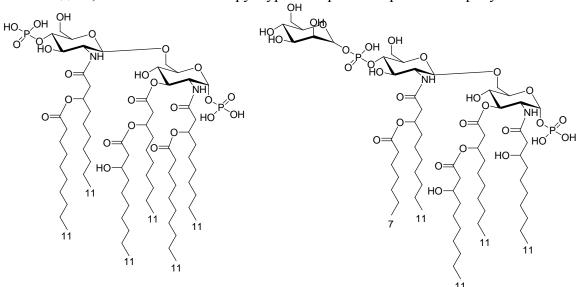


Рисунок 1. Структуры двух типов липида А M. litoralis KMM 3900^{T}

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке $P\Phi\Phi U$ в рамках научного проекта № 18-04-00618.

Структура О-специфического полисахарида морской грамотрицательной бактерии $Marinicella\ litoralis\ KMM\ 3900^{\mathrm{T}}$

<u>И.Н. Лизанов¹</u>, М.С. Кокоулин², Л.А. Романенко²

 1 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 2 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: lizanov_in@students.dvfu.ru

Химическое изучение углеводсодержащих биополимеров, образующих поверхность является важнейших проблем бактериальной клетки, одной ИЗ современного естествознания, которая состоит в изучении молекулярных основ взаимодействия живых клеток друг с другом и с окружающей средой. Несмотря на значительный прогресс в структурного анализа биогликанов области микроорганизмов, О-специфические полисахариды (ОПС) грамотрицательных бактерий исследованы крайне неравномерно. Наряду с довольно хорошо изученными ОПС патогенных и условно-патогенных бактерий, существуют менее изученные и совсем неизученные роды микроорганизмов. К последним можно отнести большинство микроорганизмов морского происхождения, хотя по количеству и разнообразию они не уступают наземным формам бактерий. Имеющиеся на данный момент результаты структурных исследований показывают, что клеточные стенки морских грамотрицательных бактерий различных родов и видов продуцируют ОПС уникального строения. В связи с этим, нами была исследована структура ОПС морской грамотрицательной бактерии Marinicella litoralis KMM 3900^{T} .

Липополисахарид (ЛПС) был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом. Деградацию липополисахарида проводили мягким кислотным гидролизом с последующим фракционированием углеводной компоненты методами гель- и анионообменной хроматографии. В результате были выделены две полисахаридные фракции (ОПС-1 и ОПС-2). Анализ методом ГЖХ ацетилированных полиолов и (S)-2-октил гликозидов показал присутствие в составе ОПС-1 остатков D-маннозы (D-Man) и L-рамнозы (L-Rha), а в ОПС-2 — D-Man и 3-O-метил-D-маннозы (D-Man3Me). Полисахариды были исследованы с помощью химических методов (дефосфорилирование, распад по Смиту) и метода спектроскопии ЯМР, в том числе двумерных экспериментов.

Было показано, что ОПС-1 построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из остатков L-Rha, замещенной в положение О-2 остатком глицерофосфата (PGro), и D-Man, несущей в положение О-6 остаток метилфосфата(PMe):

$$\rightarrow$$
4)- α -L-Rhap2PGro(\sim 45%)-(1 \rightarrow 3)- β -D-Manp6PMe(\sim 90%)-(1 \rightarrow

ОПС-2 представляет собой гомополимер, состоящий из остатков D-Man3Me, сульфатированных (S) по положению O-4 и ацетилированных (Ac) по положению O-6:

$$\rightarrow$$
2)- α -D-Manp3Me4S6Ac(\sim 90%)-(1 \rightarrow

Структуры обоих ОПС являются уникальными и ранее среди углеводсодержащих биополимеров грамотрицательных бактерий, обнаружены не были.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке $P\Phi\Phi U$ в рамках научного проекта N 18-04-00618.

Надмолекулярные структуры белка-порина из Yersinia pseudotuberculosis в липидном бислое. Морфология и условия реконструкции

Г.А. Набережных, В.А. Хоменко, О.Д. Новикова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: naber1953@mail.ru

Основные компоненты внешней мембраны (ОМ) грамотрицательных бактерий, так называемые неспецифические порины, представляют собой высокостабильные интегральные β-структурированные белки. В нативной мембране порины существуют в виде комплексов с липополисахаридом (ЛПС) и образуют очень прочную связь с пептидогликаном (ПГ), который является жестким «скелетом» бактериальной мембраны. Предполагается, что эти компоненты ОМ могут играть решающую роль в формировании двумерных кристаллов поринов при их встраивании в липидный бислой [1]. Метод самоорганизации двух- и трехмерных структур из наноразмерных составляющих рассматривается как простой и экономически выгодный способ получения наноматериалов. Подобные структуры находят широкое применение в нанобиотехнологии и наномедицине [2].

Формирование упорядоченных наноструктур порина из наружной мембраны Yersinia pseudotuberculosis проводили двумя методами: из протеолипосом, полученных из солюбилизированного в детергенте порина в присутствии синтетического фосфолипида, и прямой реконструкцией белка в предварительно сформированный на поверхность слюды фосфолипидный бислой. Морфологию полученных структур анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в жидкой среде в контактном режиме [3]. Обнаружено, что полученные из протеолипосом домены порина имели неравномерное распределение в бислое и большой разброс в диаметре (20-100 нм). При использовании прямого метода включения изолированного порина в поддерживающий фосфолипидный слой образования больших нанокластеров порина, присутствующих в первом случае, не наблюдалось. В условиях обоих описанных выше экспериментов в липидный бислой включается относительно небольшое количество порина. Самопроизвольное формирование протяженных участков пориновых наночастиц наблюдалось в слабокислой среде при использовании липидного бислоя, содержащего ЛПС. Показано, что в этих условиях происходит образование однородных и небольших по размерам доменов белка со средним диаметром 20-30 нм и высотой 5-8 нм. При использовании порина в комплексе с ПГ, для образования закрепленного в бислое белка были получены более однородные кластеры. Анализ АСМ-изображений поверхности комплекса показал, что порины встраиваются в фосфолипидный бислой с образованием регулярно расположенных доменов порина со средним диаметром 15-20 нм и высотой 5-8 нм. Комплексы имели значительно более жесткую структуру по сравнению с изолированным порином. Таким образом, разработаны методические подходы для получения биоматриц, состоящих из мембранных белковых сборок, потенциально пригодных для создания биосенсоров.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-03-00318.

- 1. Sen K., Nikaido H. // J. Bacterial. 1991. V. 173. P. 926-928.
- 2. Глик Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология: Принципы и применение. М.: Мир. 2002. C.589—602.
 - 3. Muller D.J., Engel A. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2008. V. 13. P. 338–350.

Неспецифические порины Yersinia pseudotubrtculosis, как индукторы синтеза питокинов

 $\underline{\text{О.Ю.}}$ Портнягина 1,2 , Э.Е. Родина 2 , О.Д. Новикова 1

 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток 2 Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: odd64@mail.ru

Развитие воспалительной реакции макроорганизма в ответ на массивное микробное воздействие способствует возникновению специфического гуморального иммунного Патогенные способность бактерии В процессе эволюции выработали контролировать воспалительный ответ, регулируя синтез про- и противовоспалительных цитокинов, что является одной из стратегий их выживания в макроорганизме. Подобные молекулярные механизмы описаны для бактерий рода Yersinia. Установлено, что в реализации защитных реакций участвуют различные компоненты наружной мембраны (НМ) клеток патогенных иерсиний [1], такие, например, как Уор белки. Эти белки противодействуют фагоцитозу, вызывают апоптоз макрофагов и, блокируя клеточные сигнальные механизмы, подавляют продукцию провоспалительных цитокинов [2].

Мы исследовали влияние неспецифических OmpF и OmpC поринов HM *Y. pseudotuberculosis* на цитокиновый ответ на ранних (в течение 24 часов) и поздних (через месяц) стадиях развития иммунной реакции, после однократной и трехкратной иммунизации мышей соответственно. Количество белка, введенное животным, составило и в том, и в другом случае 100 мкг/мышь. Для того, чтобы оценить отличное от липополисахарида (ЛПС) влияние поринов на синтез цитокинов, мышей иммунизировали, в том числе, поринами, обработанными полимиксином В (ПВ).

Установлено, что однократная иммунизация мышей OmpF и OmpC вызывает активацию синтеза противовоспалительного (IL-10) и провоспалительного (IL12) цитокинов. Вместе с тем, синтез TNFα, который является ключевым фактором активации системы врожденного иммунитета при бактериальной инфекции, порины ингибируют. На поздней стадии иммунного ответа, в момент формирования пула специфических антипориновых антител, уровень цитокинов IL12 и IL10 не отличался достоверно от содержания этих цитокинов в неиммунной сыворотке. Наблюдалось значительное повышение уровня TNFa в сыворотках крови мышей, иммунизированных OmpF и OmpC/ПВ, содержание TNF в сыворотках крови мышей иммунизированных OmpC практически не превышало, а в случае с Отр Г/ПВ оказалось в 2,8 раза меньше такового в контрольной сыворотке. Вероятно, в первые 24 часа, при естественном развитии инфекции, порины НМ Y. pseudotuberculosis действуют на организм теплокровного животного как факторы вирулентности и, одновременно, как активаторы факторов немедленной защиты организма. Цитокиновый ответ в присутствии поринов активируется по механизму отличному от действия ЛПС. Так, на ранних стадиях развития иммунной реакции, действие OmpC порина в отношении синтеза IL12 и IL10, в отличие от OmpF, не зависит от примеси ЛПС. На поздних этапах развития иммунного ответа присутствие примеси ЛПС в образце OmpF порина, стимулирует синтез TNFα, а сам порин, как показано при иммунизации ОтрГ/ПВ, ингибирует синтез этого медиатора воспаления. В случае ОтрС и ОтрС/ПВ наблюдается обратная зависимость.

Известно, что повышение продукции $TNF\alpha$ характеризует, в основном, развитие клеточного иммунного ответа. Однако, активация B-клеток, формирование высокого титра антипориновых антител и одновременный синтез $TNF\alpha$ после многократной иммунизации поринами свидетельствует о наличии корреляции между этими процессами, которая, видимо, необходима для формирования полноценного гуморального иммунного ответа.

^{1.} Erfurth S.E., Gröbner S., Kramer U., Gunst D.S., Soldanova I., Schaller M., Autenrieth I.B., Borgmann S. // Infect, Immun. 2004, V. 72, P. 1204–1209.

^{2.} Железникова Г.Ф., Бехтерева М.К. // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4. № 3. С. 215–224.

Пептид морской анемоны – эффективный ингибитор α-амилаз млекопитающих

 $\underline{\text{O.B. Синцова}}^1$, А.П. Калиновский^{1,2}, И.Н. Гладких¹, М.М. Монастырная¹, Е.В. Лейченко¹, Э.П. Козловская¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: sintsova0@gmail.com

Сахарный диабет второго типа развивается в результате снижения восприимчивости тканей к действию инсулина, которое часто возникает как следствие переедания, несбалансированного рациона и отсутствия физической активности. Данное заболевание широко распространено среди населения планеты (около 8% взрослых), все чаще фиксируются случаи заболевания среди детей и подростков. На стадии преддиабета и ранних стадиях сахарного диабета второго типа для лечения применяются пероральные сахароснижающие препараты. Одной из разновидностей таких препаратов являются ингибиторы панкреатической α-амилазы, позволяющие эффективно контролировать поступление глюкозы в кровь из тонкого кишечника. Ингибирование слюнной аамилазытакже несет положительный эффект, так как позволяет затормозить переваривание крахмала на первых этапах его поступления в организм. К сожалению, использующиеся в настоящее время в качестве фармакологических препаратов низкомолекулярные соединения являются малоселективными ингибиторами, и их применение сопровождается побочными эффектами. Поэтому поиск новых ингибиторов α-амилаз и изучение их свойств является актуальной научной задачей, решение которой позволит создать новые сахароснижающие средства, обладающие большей эффективностью и побочными эффектами.

В результате протеомного анализа нами было установлено, что в ядовитом секрете актинии $Heteractis\ magnifica$ наряду с разнообразными токсинами широко представлены пептидные ингибиторы α -амилаз. Один из них, магнификамид, был выделен и охарактеризован [1]. Методами генной инженерии был получен рекомбинантный аналог магнификамида. Значение константы ингибирования (K_i) активности панкреатической α -амилазы рекомбинантного магнификамида составило 0,17 нМ для свиной панкреатической α -амилазы (PPA) и 7,7 нМ для человеческой слюнной α -амилазы (HSA). Таким образом, ингибиторная активность магнификамида значительно превосходит активность акарбозы, действующего вещества лекарственных препаратов $Precose^{TM}$ и $Precose^{TM$

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-38-00389.

- 1. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. // J. Proteomics. 2018. V. 173. P. 12–21.
 - 2. Yoon S.H., Robyt J.F. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 1969–1980.

Структура и противоопухолевая активность нативных и модифицированных фукоиданов бурых водорослей рода Sargassum

В.В. Суриц, Р.В. Усольцева, Н.М. Шевченко, С.Д. Анастюк, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: suritsw@yandex.ru

Бурые водоросли рода *Sargassum* широко распространены во всех океанах и издавна употребляются в пищу. Исследования полисахаридов этих водорослей актуальны для выявления взаимосвязи их структуры и биологической активности.

Целью данной работы являлось выделение индивидуальных фракций фукоиданов из водорослей *Sargassum duplicatum* (Sd), *S. feldmannii* (Sf), *S. miyabei* (Smi), *S. oligocystum* (So), определение их структурных характеристик и противоопухолевой активности.

Из четырех видов водорослей по разработанным схемам выделения и очистки было получено семь фракций фукоиданов. Фракции SmiF1 и SoF1 представляли собой сульфатированные манногалактофуканы (27 и 35% соответственно); SdF, SfF1, SfF2, SmiF2 и SoF2 — сульфатированные галактофуканы (32, 21, 25, 30 и 32% соответственно) с различным соотношением остатков фукозы и галактозы. Ацетильные группы найдены в фукоиданах из *S. duplicatum*, *S. miyabei* и фракции SfF1 из *S. feldmannii*.

Структуры фукоиданов SdF и SfF2 былиустановлены с помощью классических химических (десульфатирование, дезацетилирование, получение меченых по кислороду низкомолекулярных производных методами автогидролиза и мягкого кислотного гидролиза в ${\rm H_2}^{18}{\rm O}$) и инструментальных (спектроскопия ЯМР модифицированного полисахаридаи масс-спектрометрия низкомолекулярных производных) методов.

Показано, что галактофукан SdF (Fuc:Gal $\sim 1:1$) содержит основную цепь из чередующихся 1,4-связанных остатков α -L-фукозы и β -D-галактозы. В ответвлениях от основной цепи предположительно по C6 остатков галактозы обнаружены цепи из 1,3-связанных 2,4-сульфатированных остатков фукозы с ветвлениями по C2, степень полимеризации которых достигала 5 моносахаридных остатков (и, возможно, более). Сульфатные группы находятся в положениях C2, C4, менее C3 остатков фукозы и C2, C3, менее C4, C6 остатков галактозы. По данным ВЭЖХ, полученная фракция фукоидана является гетерогенной по молекулярной массе – профиль элюции содержал два пика с Мw = 191 кДа (Mw/Mn = 1,42) и 34 кДа (Mw/Mn = 1,21).

Основная цепь галактофукана SfF2 (Fuc:Gal $\sim 2,5:1$) построена из 1,3-связанных остатков α -L-фукозы и β -D-галактозы с фукозными ответвлениями при C4 и C6 остатков галактозы и C2 остатков фукозы. В структуре фукоидана найдены следующие фрагменты: Fuc-(1,4)-Fuc; Gal-(1,3)-Gal; Gal-(1,4)-Gal. Сульфатные группы находятся в положениях C2, C3 и C4 остатков фукозы и C2, C3, C4 и C6 остатков галактозы. Средняя молекулярная масса фукоидана составила 183,8 кДа (Мw/Mn = 1,50).

С помощью MTS-метода показано, что нативные и модифицированные (десульфатированные и/или дезацетилированные) галактофуканы тонкивкоди цитотоксической активности в концентрации до 400 мкг/мл. Методом мягких агаров определено, что фукоиданы обладают противоопухолевым эффектом по отношению к клеткам карциномы толстого кишечника человека HCT-116, HT-29 и DLD-1. В отношении клеток DLD-1 наиболее эффективны фукоиданы из S. duplicatum (ингибирование формирования и роста колоний составило 70%), HCT-116 и HT-29 – из S. feldmannii (53 и 33% соответственно). Дезацетилирование галактофукана из S. duplicatum слегка повышает противоопухолевый эффект, либо не влияет на его активность. Десульфатированные производные фукоиданов из S. duplicatum и S. feldmannii обладают либо сходным с нативными, либо более слабым противоопухолевым действием.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-54-54005.

Структурное разнообразие ламинаранов бурых водорослей

Р.В. Усольцева, Т.Н. Звягинцева, С.П. Ермакова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: Usoltseva-R@yandex.com

Ламинараны представляют собой биологически активные водорастворимые полисахариды бурых водорослей, состоящие из остатков β-D-глюкозы, соединенных 1,3-или 1,3- и 1,6-связями. Представители данного класса соединений различаются такими структурными характеристиками, как структура основной цепи, наличие/отсутствие ответвлений, молекулярная масса, соотношение связей 1,3:1,6, количество и структура боковых цепей [1,2]. Молекулярная масса большинства ламинаранов невелика и варьирует от 3 до 10 кДа. Фракции полисахаридов с необычно большой молекулярной массой были выделены из Saccharina cichorioides, Saccharina gurjanovae и Eisenia bicyclis [2-4].

Ламинараны с наиболее простой структурой были получены из Laminaria hyperborea, S. gurjanovae и Turbinaria conoides и представляли собой практически линейные 1,3-глюканы с содержанием 1,6-связанных остатков глюкозы не более 1-2% [3,5,6]. Большая часть известных ламинаранов содержит основную цепь из 1,3-связанных остатков глюкозы с ответвлениями в виде единичных остатков глюкопиранозы по С6. Соотношение связей 1,3;1,6 у этих ламинаранов может быть различным: от трех до десяти 1,3-связанных остатков глюкозы на один 1,6-связанный. Ламинараны такого типа были выделены из Desmarestia viridis, Dictyota dichotoma, Alaria angusta, Alaria marginata, S. cichorioides, S. gurjanovae, Saccharina japonica, Sargassum trichophyllum, Turbinaria murrayana [1-3,7-10]. Небольшое количество ламинаранов имело гораздо более сложную структуру. Так, полисахариды из Chorda filum [11], E. bicyclis [4], Ecklonia radiata [12] и Cysfophora scalaris 1,3;1,6-β-D-глюканы с представляли собой сильноразветвленные содержанием 1,6-связанных остатков глюкозы, которые находились не только в ответвлениях, но и в основной цепи. Интересный по структуре ламинаран был получен из Ascoseira mirabilis [13]. Он содержал значительное количество как 1,3-, так и 1,6-связанных остатков глюкозы. Но, в отличие от вышеописанных ламинаранов, в структуре данного полисахарида было обнаружено очень низкое количество 1,3,6-связанных остатков глюкозы. Данный факт свидетельствует либо о слаборазветвленной блочной структуре данного полисахарида, либо о наличии небольшого количества длинных 1,6-связанных боковых цепей. Таким образом, при обобщении структурных данных об известных представителях класса ламинаранов, было показано, что структурные варианты данных полисахаридов достаточно разнообразны.

Работа выполнена при поддержке грантов ДВО РАН № 18-4-010 и РФФИ № 18-34-20013.

- 1. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Gorbach V.I., Urvantseva A.M., Kiseleva M.I., Isakov V.V. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 294. P. 1–13.
 - 2. Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1349–1358.
- 3. Шевченко Н.М., Анастюк С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренок П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. //Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 96-107.
- 4. Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastyuk S.D., Isakov V.V., Dubrovskaya Yu.V., Kusaykin M.I., Um B.H., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Polym. 2014. V. 99. P. 101–109.
 - 5. Nelson T.E., Lewis B.A. // Carbohydr. Res.1974. V. 33. P. 63–74.
- 6. Chattopadhyay N., Ghosh T., Sinha S., Chattopadhyay K., Karmakar P.,Ray B. // Food Chem.2010. V. 118. P. 823–829.
- 7. Usoltseva (Menshova) R.V., Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. // Carbohydr. Polym. 2016. V. 153. P. 258–265.
- 8. Shevchenko N.M., Usol'tseva (Men'shova) R.V., Ishina I.A., Thinh P.D., Ly B.M., Ermakova S.P. // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53. P. 1–5.
 - 9. Lee J.B., Takeshita A., Hayashi K., Hayashi T. // Carbohydr. Polym. 2011. V. 86. P. 995–999.
 - 10. El-Sayed M.M. // Carbohydr. Res. 1982. V. 110. P. 277-282.
 - 11. Усов А.И., Чижов А.О. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 208-216.
 - 12. Ram S., Beyer R, Shepherd M.G., Sullivan P.A. // Carbohydr. Res. 1981. V. 96. P. 95–104.
 - 13. Finch P., Percival E., Slaiding I. R., Weigel H. //Phytochemistry. 1986. V. 25. P. 443–448.

Определение физико-химических характеристик и биологической активности лектина из брюхоногого моллюска *Tectusconus*

А.П. Фильштейн, И.В. Чикаловец, О.В. Черников

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: alishichka@mail.ru

В настоящее время такой класс белков, как лектины, занимает все большее место в биологических исследованиях. Лектины являются белками неиммуноглобулиновой природы, способные избирательно и обратимо связывать углеводные структуры гликоконъюгатов, а также полисахариды без нарушения ковалентной структуры связываемых углеводов [1]. Морские организмы относятся к числу сравнительно новых источников лектинов. Особый интерес вызывают лектины морских беспозвоночных. Они участвуют в таких неспецифических иммунных реакциях как агглютинация, опсонизация, фагоцитоз, лизис и способны избирательно агглютинировать грамположительные и грамотрицательные бактерии. Ранее был проведен скрининг гемагглютинирующей активности в экстрактах морских брюхоногих моллюсков Южно-Китайского моря. В качестве объекта исследования нами был выбран моллюск *Tectusconus*, обладающий лучшей гемагглютинирующей активностью.

Выделение лектина проводили методом аффинной хроматографии. Гомогенность лектина и его молекулярный вес определяли методом SDS-электрофореза. В результате получили муцин-специфичный лектин (TCLec), который состоит из двух субъединиц с приблизительной молекулярной массой 60 и 72 кДа. Изучение физико-химических характеристик показало, что TCLec является Ca^{2+} - зависимым, термостабильным. Активность лектина сохранялась в промежутках рH от 7,5 до 10.

С целью определения биологической активности лектина были проведены эксперименты по связыванию TCLec с патогенными микроорганизмами (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Vibrio proteolyticus, Candida albicans) ингибированию им роста микроорганизмов и влиянию лектина на образования биопленок. В результате, было установлено, что TCLec связывается с со всеми микроорганизмами, агглютинирует их, образуя агрегаты. Показано, что TCLec влияет на образование биопленок, уменьшая биомассу грамположительной бактерии S. aureus на 56% и грамотрицательной бактерии V. proteolyticus на 20%. В остальных случаях наблюдается стимуляция роста биопленок, вероятно это связано с тем, что лектины, связываясь с поверхностью микроорганизмов, могут препятствовать не только адгезии бактерий к поверхности и затруднению их агрегации друг с другом, но и могут участвовать в процессе формирования биопленки, принимая участие в симбиотическом сообществе, и помогают выживать другим участникам этого сообщества [3].

Исходя из полученных данных, можно предположить, что TCLec проявляет антибактериальную активность, так как способен агглютинировать клетки бактерий и препятствует их дальнейшему росту.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО ВАНТ 18-005.

- 1. Луцик А.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д // Львов: Выща школа. 1981. 156 с.
- 2. Bjarnsholt T., Ciofu O., Givskov M. // Nature. 2013. V. 12. P. 791–808.

Молекулярное клонирование гена оксидоскваленциклазы 2 из тканей кишечника голотурии Eupentacta fraudatrix

В.Е. Чаусова 1 , С.Н. Балдаев 2 , К.В. Гузев 1 , Е.П. Быстрицкая 1 , М.П. Исаева 1 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Дальневосточная голотурия E. fraudatrix (тип Иглокожие) является интересным и богатым источником тритерпеновых гликозидов с уникальной химической структурой и широким спектром фармакологической (биологической) активности [1,2]. Тритерпеновые гликозиды выполняют, главным образом, защитную функцию, в том числе обеспечивают защиту от хищников, паразитов и микроорганизмов. Тритерпеновые гликозиды относятся к наиболее распространенным природным соединениям, для которых понимание особенностей биосинтеза наблюдаемого структурного разнообразия остается областью фундаментальных исследований, предполагая в будущем интересные открытия. Помимо тритерпеновых гликозидов, голотурии синтезируют необычные $\Delta^{7(8)}$ - или $\Delta^{9(11)}$ -стерины, которые снижают мембранолитическое действие собственных сапонинов.

Стерины и тритерпеновые гликозиды имеют общий биосинтетический предшественник: 2,3-оксидосквален, в циклизации которого участвуют мембранные ферменты – оксидоскваленциклазы (OSC; EC 5.4.99.7) [3]. Обычно продуктами циклизации является ланостерин (у животных и грибов), циклоартенол (у высших растений и некоторых простейших) и паркеол (в рисе *Oryzasativa* и у некоторых бактерий и грибов). Недавние исследования показали удивительные результаты, указывающие на то, что у голотурий *Stichopus horrens* и *Apostichopus japonicus* присутствуют гены двух оксидоскваленциклаз [4,5]. Функциональный анализ дрожжей, продуцирующих LAS1 и LAS2 из *А. japonicus*, показал, что циклизация 2,3-оксидосквалена LAS1 усиливает продукцию паркеола, а LAS2 – 9β-ланоста-7,24-диенола, вместо ланостерина.

В данной работе, используя методы генной инженерии (5'- и 3'-RACE), была *установлена* последовательность нового гена оксидоскваленциклазы (OSC2), экспрессируемого в тканях кишечника голотурии E. fraudatrix. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности OSC2 с последовательностями OSC других эукариот показало, что фермент имеет высокую гомологию (68-69% идентичности) с оксидоскваленциклазами из голотурий S. horrens и A. japonicus, в том числе и с OSC1из E. fraudatrix (78% идентичности). Последовательность OSC2 содержит консервативные QW-мотивы, которые стабилизируют структуру фермента и высоко консервативный мотив DCTAE, участвующий в связывании и протонировании субстрата. Первичная структура OSC2 характеризуется наличием классического для оксидоскваленциклаз активного центра, представленного высоко консервативными функционально важными аминокислотными остатками.

Является ли паркеол или 9β-ланоста-7,24 диенол продуктом циклизации OSC2, еще предстоит определить.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-14-01065.

- 1. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. // Nat. Prod. Commun. 2013. V. 8. P. 1053–1058.
- 2. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. // Nat. Prod. Commun. 2012. V. 7. P. 845–852.
 - 3. Wendt K.U, Poralla K., Schulz G.E. // Science. 1997. V. 277. P. 1811–1815.
 - 4. Liu H., Kong X., Chen J., Zhang H. // Aquaculture. 2018. V. 491. P. 358–367.
- 5.Li Y., Wang R., Xun X., Wang J., Bao L., Thimmappa R., Ding J., Jiang J., Zhang L., Li, T., et al. // Cell Discov. 2018. V. 4. P. 29.

² Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук, Владивосток Электронная почта: v.chausova@gmail.com

Структура и эволюция альгинолитической системы рода Zobellia

Н.Ю. Чернышева, М.П. Исаева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: chernysheva.nadezhda@gmail.com

Альгиновые кислоты составляют значительную часть биомассы бурых водорослей и являются одними из важнейших питательных веществ для морских гетеротрофных бактерий [1]. Под действием ряда гидролитических ферментов бактерий биополимеры преобразуются до конечных соединений, которые ассимилируются через центральный метаболизм. В геномах бактерий гены таких ферментов часто кластеризованы в оперонподобные локусы, образующие систему по утилизации альгинатов (АУС). Было показано, что АУС в разной степени распространены среди представителей Bacteroidetes и Proteobacteria. Наиболее сложно устроенные кластеры обнаружены у флавобактерий, среди Zobellia galactanivorans является одним из модельных деградирующих организмов с известной АУС [2]. Цель данного исследования состояла в изучении структуры и эволюции альгинолитической системы у разных представителей рода Zobellia.

Стравнительный геномный анализ локусов по утилизации альгиновых кислот был осуществлен для пяти флавобактерий. Геномы типовых штаммов *Z. amurskyensis* KMM 3526T и *Zobellia laminariae* KMM 3676T были получены нами ранее, а геномы *Zobellia galactanivorans* DsiJT, *Zobellia uliginosa* DSM 2061 и *Zobellia* sp. MAR_2009_138 были получены из базы данных GenBank NCBI. Предсказание и аннотирование генов АУС было осуществлено с помощью сервера RAST, идентификация функциональных доменов осуществлена на серверах InterPro, Pfam, и dbCAN2. Установление субклеточной локализации ферментов выполнено согласно [3]. Анализ архитектуры генных кластеров осуществлен с помощью Mauve, филогенетические деревья построены с использованием программы MEGA v.6.06.

Установлено, что все геномы Zobellia кодируют сложную альгинолитическую систему, которая организована в малый и большой опероны. В составе большого оперона, наряду с генами альгинат-лиаз, содержатся гены рецепторов и транспортных белков, а также регуляторных белков. Малый оперон несет только гены альгинат-лиаз. Сравнительный анализ структуры оперонов выявил значительное эволюционное сохранение как в отношении генного состава, так и в отношении синтении. Филогенетический и функциональный анализ генов ключевых альгинат-лиаз показали наличие дупликаций, а также замен в функциональных доменах паралогов, что возможно свидетельствует о разной субстратной специфичности. Таким образом, представители рода Zobellia способны перерабатывать альгинаты разного состава в составе бурых водорослей, что отражает их экологическую значимость в естественной среде обитания, а различия в АУС позволяют бактериям занимать различные экологические ниши.

- 1. Martin M., Portetelle D., Michel G., Vandenbol M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 2917–2935.
- 2. Thomas F., Barbeyron T., Tonon T., Génicot S., Czjzek M., Michel G. // Env. Microbiol. 2012. V. 14. N 9. P. 2379–2394.
 - 3. Romine M.F. // BMC genomics. 2011. V. 12. V. 1. S1.

Использование полисахаридов водорослей для получения биоцидных наночастиц серебра

 $\underline{\text{Ю.А. Югай}}^1$, Р.В. Усольцева 2 , С.П. Ермакова 2 , Ю.Н. Шкрыль 1 1 ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток 2 Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: yuya1992@mail.ru

В современной нанотехнологии значительную роль играют исследования наночастиц металлов. Это обусловлено широким спектром возможностей их практического счет специфических свойств как самих наночастиц, модифицированных ими материалов. В наноразмерном состоянии многие вещества приобретают новые свойства и становятся активными в биологическом отношении [1]. Это открывает новые возможности использования наноматериалов в области биомедицины, фармакологии, производства продуктов питания решения экологических, биотехнологических и сельскохозяйственных проблем [2]. Разработка альтернативных биологических и биохимических методов синтеза наночастиц является актуальной задачей в области бионанотехнологии [3]. В последнее время особый интерес вызывают полисахариды морских водорослей в качестве как восстанавливающих, стабилизирующих агентов ввиду их биологической активности.

Для проверки предположения о том, что отдельные полисахариды способны выступать в роли восстановителей ионов металлов, мы изучили восстановительный потенциал полисахаридов водорослей Saccharina cichorioides и Fucus evanescenes: фукоидан, ламинаран и альгинат. Все изученные полисахариды обладали способностью быстро (в течение нескольких минут) восстанавливать ионы серебра с формированием сферических наночастиц. При этом биосинтетическая способность полисахаридов убывала в ряду: альгинат, ламинаран, фукоидан. Размер частиц варьировал в пределах от 45 до 64 нм, а величина их дзета-потенциала составляла от -28 до -32 мВ. Наличие кристаллической фазы атомарного серебра было подтверждено с помощью рентгеновской дифракции. Включение полисахаридной матрицы в состав кристалла показано с использованием Фурье-ИК-спектроскопии.

Для определения антибиотической активности наночастиц в отношении животных и растительных патогенных бактерий $Escherichia\ coli$ и $Agrobacterium\ tumefaciens$ проводили диск-диффузионный анализ с концентрацией частиц от 10 до 60 мкг/диск. По истечению времени инкубации наблюдали положительную корреляцию величины зоны ингибирования роста с увеличением концентрации наночастиц в пределах 1,3-2,1 мм. При этом наибольшую активность в эксперименте проявили частицы, полученные с использованием фукоидана. Для определения 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}) изучали кинетику роста бактерий в жидких средах в присутствии наночастиц. В целом, IC_{50} для наночастиц, полученных с использованием всех полисахаридных матриц в отношении $E.\ coli\ u\ A.\ tumefaciens$ оказалась схожей и варьировала в интервале 8-10 и 9-13 мкг/мл соответственно. Таким образом, полисахариды водорослей могут служить альтернативой существующим химическим и физическим способам получения биоцидных наночастиц серебра при мягких условиях.

Работа выполнена при поддержке гранта ДВО РАН № 18-3-044.

- 1. Martinez-Castanon G.A., Nino-Martinez N., Martinez-Gutierrez F., Martinez-Mendoza J.R., Ruiz F. // J. Nanoparticle Res. 2008. V. 10. P. 1343–1348.
 - 2. Xu Y.P., Tian Z.J., Lin L.W. // Chin. J. Catalysis. 2004. V. 25. P. 331–338.
 - 3. Besinis A., De Peralta T., Handy R.D. // Nanotoxicol. 2014. V. 8. P. 1–16.

Секция 4 Биологические источники природных соединений

Вещества здоровой и разрушенной бурой водоросли до и после усвоения морским ежом, их действие на ламинариназу ежа, оплодотворение и развивающиеся эмбрионы морского ежа Strongylocentrotus intermedius A. Agassiz, 1863¹

М.И. Киселева, Н.В. Звягинцев, С.П. Ермакова, Т.Н. Звягинцева Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: mikiseleva@mail.ru

Морские ежи принадлежат к одной из немногих групп беспозвоночных, привлекающих внимание исследователей разных специальностей. Одним из наиболее важных для экспериментальных целей морских ежей, обитающих в морях России, является Strongylocentrotus intermedius. В Приморье S. intermedius питается в основном ламинариевыми водорослями: на севере Saccharina japonica, на юге - Saccharinacichorioides, в районах произрастания которых отмечены его массовые поселения [1]. При натурных наблюдениях отмечено, что морской еж предпочитает слоевища ламинарии в притопленных выбросах, то есть растения, оторвавшиеся от грунта, побывавшие на берегу и вторично смытые волнами в море [1].

Исследования пищевой привлекательности образцов здоровой и разрушенной водоросли второго года жизни показали, что здоровая водоросль ежом поедается на 3-5%, разрушенная – на 50-75%. Для изучения пищевого выбора морского ежа были применены биохимические методы [2]. Чтобы выяснить причины предпочтения ежом разрушающихся водорослей было проведено сравнение влияния водно-этанольных экстрактов здоровой и разрушающейся водоросли и экскрементов, полученных после поедания ежами этих образцов водорослей, на 1,3-β-D-глюканазу – пищеварительный фермент, оплодотворение и развитие эмбрионов морского ежа [2,3]. Биохимическое исследование показало, что процессы пищеварения и размножения морских ежей в значительной мере контролируются метаболитами водорослей, которые способны в определенные моменты жизненного цикла водоросли привлекать или отпугивать морских животных, проявляя в последнем случае функции Обнаружение активаторов 1.3-В-D-глюканазы защитные [1]. ежа разрушающихся и ингибиторов процессов оплодотворения в свежевыловленных водорослях совпадает с натурными наблюдениями.

Полисахариды были выделены из всех исследуемых образцов водоросли. Сравнительное изучение деталей их структуры химическими методами и ЯМР-спектроскопией показало, что ламинараны из всех образцов являются $1,3;1,6-\beta$ -D-глюканами, имеющими не более 10% β -1,6-связанных остатков D-глюкозы в качестве разветвлений, что типично для основной структурной группы этих полисахаридов [4]. Все полученные полисахариды не ингибировали оплодотворение и оказывали положительное действие на жизнеспособность эмбрионов морского ежа, отличаясь действующими концентрациями. Наиболее благоприятное влияние на развивающиеся эмбрионы оказывал фукоидан из разрушенной водоросли.

Анализ данных показывает значительные отличия химического состава экскрементов от образца водоросли, из которой они получены, что позволило идентифицировать ряд соединений, усваиваемых ежом. Интересным кажется изменение структуры фукоидана в процессе разрушения или переваривания водоросли ежом, наглядно показанное с помощью ¹³С-ЯМР. Выполненная работа является комплексным исследованием влияния веществ водорослей на жизнедеятельность морского ежа.

Работа выполнена при поддержке грантаРФФИ № 18-04-00905.

- 1. Крупнова Т.Н., Павлючков В.А. // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 134, С. 195–208.
- 2. Агаркова В.В., Крупнова Т.Н. и др. // Прикладная биохим. и микробиол. 2007. Т. 43. № 4. С. 511–517.
 - 3. Киселева М.И., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н. // Биология моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 437–446.
- 4. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al.// J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 294. N 1. P. 1–13.

Характеристика новых каррагинан-деградирующих бактерий, изолированных из красной водоросли *Tichocarpus crinitus*

О.И. Недашковская А.Д. Кухлевский 2,3

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

³Дальневосточный федеральный университет, Владивосток Электронная почта: olganedashkovska@piboc.dvo.ru

Бактерии филума Bacteroidetes известны своей способностью деградировать полисахариды морской среды, и в частности, каррагинаны, которые являются сульфатированными галактанами. Данные соединения имеют большое экономическое значение, так как находят применение в различных областях деятельности человека: пищевой и косметической промышленности и в медицине. Ранее мы провели скрининг каррагиназной активности штаммов-ассоциантов красной водоросли Tichocarpus crinitus, обитающей в прибрежной зоне Японского моря [1]. Целью настоящего исследования было изучение фенотипических характеристик штаммов бактерий, которые показали высокую каррагиназную активность, представляющих научный интерес ДЛЯ дальнейших исследований. Клетки изученных штаммов бактерий были гетеротрофными. грамотрицательными, аэробными, палочковидными и подвижными благодаря скользящему движению по субстрату. Штаммы 9Alg 1, 9Alg 188 и 9Alg 211 образовывали ярко-жёлтые, слегка выпуклые и блестящие колонии; колонии штамма 9Alg 79 были желто-оранжевого цвета. Для всех изученных штаммов, включая типовые штаммы валидно описанных видов Cellulophaga lytica, Cellulophaga baltica и Aquimarina algiphila, отмечено присутствие кислой и щелочной фосфатаз, каталазы, эстеразы (С4), валин-, лейцин- и цистинариламидаз, оксидазы и нафтол-AS-BI-фосфогидролазы; способность гидролизовать агар, желатин; крахмал, ДНК, КМ-целлюлозу и тирозин и образовывать кислоту из D-глюкозы. Отрицательные результаты были получены при тестировании образования кислоты из Lарабинозы, L-рамнозы и N-ацетил глюкозамина; продукции флексирубинов, индола и сероводорода, активности β-глюкуронидазы, α-фукозидазы и липазы Филогенетический анализ, основанный на секвенировании 16S рРНК гена, показал принадлежность штаммов к сем. Flavobacteriaceae филума Bacteroidetes. Штаммы 9Alg 1, 9Alg 188 и 9Alg 211 относились к одному роду, Cellulophaga. Ближайшим родственным видом штамма 9Alg 1 был *C. lytica* с 99,9% гомологии последовательностей. Штаммы 9Alg 188 были идентичны друг 9Alg 211 другу и показали 99,8% последовательностей к типовому штамму другого вида, С. baltica. Штамм 9Alg 79 был отнесён к недавно описанному нами виду рода Aquimarina, A. algiphila, также выделенному из данной водоросли с гомологией последовательностей 100% [2]. Результаты проведенного сравнительного филогенетического и фенотипического анализа позволяют отнести штаммы 9Alg 188 и 9Alg 211 к новому виду рода Cellulophaga и расширить диагнозы видов Aquimarina algiphila и Cellulophaga lytica, к которым относятся штаммы 9Alg 79 и 9Alg 1 соответственно. Следует отметить, что способность гидролизовать каррагинан была ранее отмечена у бактерий вида *С. lytica* [3], но для представителей вида C. baltica и рода Aquimarina это свойство отмечено впервые.

^{1.} Kalitnik A.A., Nedashkovskaya O.I., Stenkova A.M., Yermak I.M., Kukhlevskiy A.D. // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 2071–2081.

^{2.} Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Kim S-J, Bakunina I.Y., Rhee S.K.// Arch. Microbiol. 2014. V. 196. P. 745–752

^{3.} Yao Z., Wang F., Gao Z., Jin L., Wu H. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 24592–24602.

Биологически активные вещества морского происхождения как ингибиторы образования биопленок

Н.А. Терентьева¹, Н.С. Буйновская¹, Ю.А. Носкова¹, Л.В. Слепченко¹, А.В. Володько¹, О.И. Недашковская¹, Н.Ф. Тимченко², Л.С. Долматова³, М.Г. Елисейкина⁴, Л.А. Балабанова¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток ²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова ДВО РАН Владивосток ³Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток ⁴Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток Электронная почта: nattere@mail.ru

Большинство видов бактерий существуют в природе не в виде свободно живущих клеток, а в виде специфически организованных биопленок (biofilms), что защищает бактерии от неблагоприятных абиотических факторов внешней среды, а также от факторов специфической и неспецифической защиты иммунной системы хозяина. Целью работы было изучение действия некоторых веществ и гидролитических ферментов из морских микроорганизмов на формирование и разрушение биопленки, образованной разными видами микроорганизмов, в том числе и патогенными бактериями. В работе использовали штаммы Bacillus subtilus, B. licheniformis, B. aegricola, B. berkelogi, Pseudomonas aeruginosa, Yersinia pseudotuberculosis, Salmonella enteritidis.

Рекомбинантный белок *α***-галактозидазы** морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 вызывал небольшое увеличение количества биопленок морских бактерий В. licheniformis, В. aegricola, В. berkelogi. В то же время, у патогенных бактерий родов Pseudomonas, Yersinia, Salmonella в присутствии фермента количество образовавшейся биопленки снижалось на 20-30%. Обработка зрелой биопленки α-галактозидазой приводила к разрушению до 35% биопленки у разных видов бацилл и патогенных бактерий. Эндо-1,3**β-D-глюканаза** из морской бактерии *Formosa algae* ингибировала формирование биопленки у разных штаммов Y. pseudotuberculosis до 70%. На уже сформировавшуюся биопленку 1,3-β-глюканаза не оказывала влияния. Фосфодиэстераза морской бактерии Cobetia amphilecti и **щелочная фосфатаза** Cobetia marina оказывали ингибирующее действие на биопленки В. licheniformis, В. aegricola, В. berkelogi и Р. aeruginosa на 20-50% а также диспергировали уже сформированные биопленки этих видов. Формирование биопленок моно- и смешанными культурами бактерий Y. pseudotuberculosis и S. enteritidis в разной степени ингибировалось фосфодиэстеразой, а-галактозидазой и щелочной фосфатазой. Разрушение зрелых биопленок для исследуемых ферментов составляло до 30%.

ДНКаза гепатопанкреаса краба уменьшала количество образующейся биопленки *Y. pseudotuberculosis* в двое и на 30-50% разрушала уже образовавшуюся биопленку за счет гидролиза экстраклеточной ДНК матрикса.

Комплексы **хитозан-каррагинан** с высоким содержанием каппа-каррагинана ингибировали образование биопленок бактериями *E. coli* и *B. subtilis* как при добавлении в культуру, так и при предварительной обработке поверхностей (ингибирование до \sim 70%).

Гистохром из панцирей дальневосточного морского ежа и **пентакан** из голотурий *Eupentacta fraudatrix, Cucumaria japonica, Apostichopus japonicus* ингибировали формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* на ~50%. Электронная микроскопии на ряду с эффектом деградации биопленки выявила наличие значительного изменения морфологии внеклеточного матрикса.

Терапия, направленная на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективной, чем стандартное антибактериальное лечение.

Заочные участники

Stratum corneum. Роговой слой кожи как источник информации о патологиях формирования кожи при атопических заболеваниях

И. Бронова, Е. Голева, Дональд Льюнг, Е. Бердышев

Национальный медицинский центр, Денвер, США Электронная почта: eberdyshev@gmail.com

Основной функцией кожного покрова является обеспечение барьера, защищающего организм от потери влаги и от проникновения внутрь различных бактерий, вирусов и аллергенов. Роговой слой кожи, stratum corneum, состоит из корнеоцитов, а также специфических белков и липидов, образованных кератиноцитами на последних этапах дифференцировки. В случае нарушений состава и организации этой сложной структуры, кожа теряет свои барьерные функции, что приводит к развитию кожных заболеваний, таких как атопический дерматит, псориаз, ихтиоз, контактный дерматит и других. Эти изменения могут быть обусловлены генетическими причинами, а также гиперактивированным иммунным ответом.

Липиды stratum corneum представлены главным образом холестерином, свободными жирными кислотами и церамидами. В процессе дифференцировки кератиноцитов церамиды претерпевают сложные изменения, которые ведут к образованию длинных гидрофобных молекул. Эти изменения обусловлены активацией биосинтеза ультра-длинных жирных кислот (до 36 углеродных атомов) с одновременной активацией их омега-окисления и экспрессии ферментов, которые образуют уникальные для кожи омега-этерифицированные церамиды. Одновременно с удлинением N-ацилированных жирных кислот в церамидах удлиняются и сами сфингозиновые основания с обычных 18 углеродных атомов до 22 и более. В коже больных экземой биосинтез и трансформация церамидов нарушаются, и современные масс-спектрометрические подходы помогают подробно охарактеризовать эти Нами недавно была предложена процедура, которая проанализировать методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии одновременно липиды и полярные компоненты stratum corneum, который собирают неинвазивно с помощью кожных стрипов D-Squame компании CuDermTM. Проведенные нами исследования показали, что заметные изменения в липидах stratum corneum происходят не только в экземных, но также и в непоражённых участках кожи больных атопическим дерматитом, и в целом выражаются в укорочении жирных кислот и уменьшении доли омега-этерифицированных церамидов. Используя клеточные и животные модели, мы показали, что эти изменения связаны с гиперактивацией иммунного ответа второго типа [1]. Наша последующая работа показала, что у детей с атопическим дерматитом наиболее выраженные изменения в липидах кожи наблюдаются у больных с дополнительной пищевой аллергией к арахису [2]. Кроме того, мы показали, что уровень свободных сфингозиновых оснований в stratum corneum атопических больных снижен по сравнению с кожей здоровых людей, однако у больных Eczema herpeticum (атопический дерматит, осложнённый вирусом Herpes simplex) он повышен, что указывает на возможную связь активации сфинголипидного метаболизма и репликации вируса. Действительно, мы установили, что блокирование *in vitro* экспрессии в кератиноцитах человека фермента сфингозин-1-фосфат лиазы (SGPL1), который метаболизирует сфингозин-1-форсфат (S1P), приводит к увеличению клеточного уровеня S1P и удваивает число вирусных частиц. Таким образом, масс-спектрометрический анализ липидов и полярных компонентов рогового слоя кожи позволяет оценить биохимические процессы, происходящие в глубинных слоях кожи, предположить возможные механизмы, ведущие к нарушению барьерной функции кожи, и также он может быть использован как диагностический подход для установления предрасположенности к атопическим заболеваниям.

^{1.} Berdyshev E., Goleva E., Bronova I., Dyjack N., et al. // JCI Insight. 2018. V. 3. P. e98006

^{2.} Leung D.Y.M., Calatroni A., Zaramela L.S., Le Beau P.K. et al. // Sci. Transl. Med. 2019. V. 11. P. eaav2685.

Особенности формирования тримеров у коллагенов, ассоциированных с фибриллами

В.П. Иванова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Электронная почта: valet@iephb.ru

Коллагены, ассоциированные с фибриллами (КАФ), образуют одно из подсемейств коллагенов (типы IX, XII, XIV, XVI, XIX-XXII). КАФ содержат коллагеновые (К) домены, представляющие собой участки из повторяющихся трипептидов (GXY), и неколлагеновые (НК) сегменты (не-GXY-последовательности). Молекула КАФ представляет собой полимер, состоящий из трех генетически различных или идентичных α-цепей.

Процесс тримеризации α -цепей у КАФ определяется структурной организацией этих молекул. Показано, что образование и стабилизация протомеров у коллагенов XII и XIV зависит как от K1-, так и от HK1-доменов. Участок, содержащий два консервативных остатка Cys, на границе доменов K1 и HK1 определяет узнавание α -цепей и образование тройной спирали в зоне K1-доменов трех α -цепей. Формирующаяся тройная спираль стабилизируется межцепочечными дисульфидными связями по консервативным остаткам Cys. При этом третья α -цепь при тримеризации делает изгиб и образует над двумя другими α -цепями петлю. Пространственная несимметричность петли обусловлена образованием дисульфидных связей обоих остатков Cys третьей α -цепи с остатками Cys оставшихся α -цепей, расположенных у последних симметрично в конце K1-доменов. Завершается процесс тримеризации быстрым распространением скручивания суперспирали от C- к N-концу молекулы протомера.

Ранее считали, что тримеризация α-цепей коллагена типа IX протекает также, как у рассмотренных выше коллагенов. Однако тримеры коллагена IX образуются и без доменов К1 и НК1. Существуют данные о вовлечении НК2-домена в узнавание α-цепей и скручивании тройной спирали В ходе гетеротримеризации коллагена гомотримеризации коллагена XIX. Предполагается, что способность НК2-доменов модулировать образование суперспирали определяется наличием в их последовательностях двух перекрывающихся гептадных повторов (abcdefg). У всех КАФ выявлены два частично перекрывающихся гептадных повтора с размытыми границами. Нечеткость границ гептадных повторов в НК2-домене у КАФ может свидетельствовать об их вторичной роли в процессах тримеризации α-цепей.

Скорее всего, выбор α-цепей и их скручивание у КАФ является кооперативным процессом, в который вовлечены К1-домен и не менее двух С-концевых НК-доменов. Нам представляется, что С-концевая часть К1-домена вовлечена в процесс селекции α-цепей в ходе тримеризации, т.к. зона перехода от регулярных и нерегулярных структур (НКдомена) к коллагеновой спирали (К-домену) сигнализирует не только о пространственной локализации доменов, но и об их длине и особенностях строения первичной структуры, определяющих расположение остатков Суѕ. Известно, что чем длиннее К-домен, расположенный вслед за НК-доменом, тем быстрее происходит образование тройной протомера. Различная структурная организация олигомеризации/тримеризации влияет на стабильность формирующихся молекул тримеров. От числа сайтов, в которых нарушается коллагеновая спираль у а-цепей, зависит число изгибов молекулы протомера и количество суперспирализованных зон. И, наконец, консервативное расположение остатков Cys в аминокислотной последовательности α-цепей формирование «скреп», фиксирующих контактирующие определенном положении в пространстве, способствуя стабилизации тримера.

Работа выполнена в рамках государственного задания ΦAHO России (№ государственной регистрации AAA-A18-118012290371-3).

Дополнение

Памяти академика Георгия Борисовича Елякова

Е.Г. Елякова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинников РАН, Москва

Электронная почта: elyakova@yandex.ru

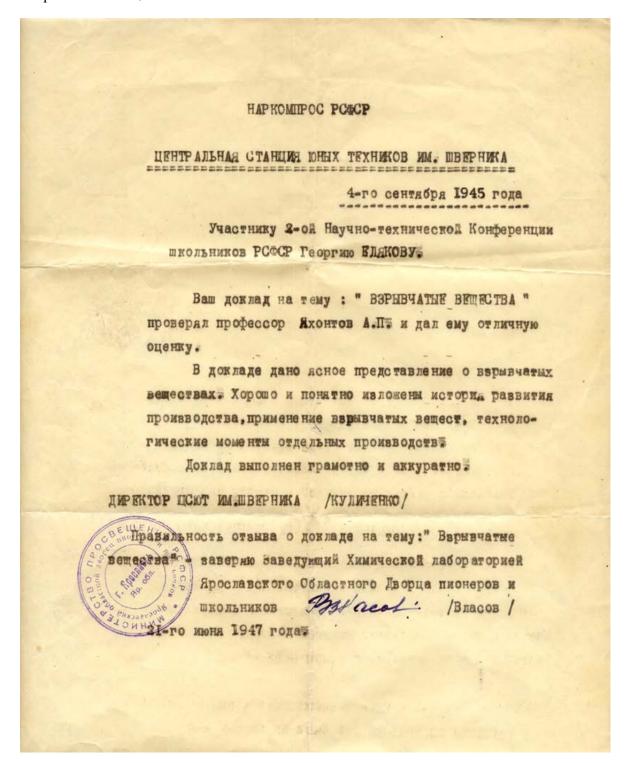
Мой отец Г.Б. Еляков родился в Костроме, детство провел в Ярославле. Ниже представлена фотография, сделанная на Волгострое, это на противоположном от Ярославля берегу Волги (село Воздвиженское), туда глава семейства был направлен на работу на завод резино-технических изделий, и семья получила временное жильё на период с 1945 по 1950 годы.



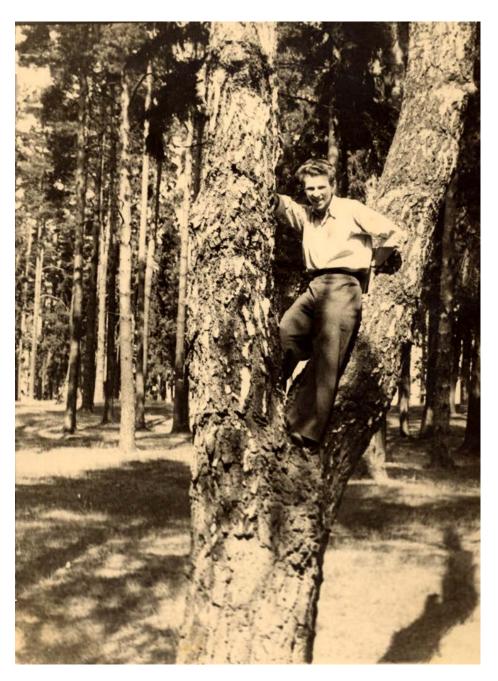
Отец – Еляков Борис Васильевич, мама – Елякова Наталья Николаевна (в девичестве Сиротина), Юра (Георгий Борисович) и его сестра Галя, Волгострой, село Воздвиженское, примерно 1947 год.

Юра в это время жил один в Ярославле, так как учился в старших классах ярославской средней школы № 44 и уже был увлечен химией, занимаясь в химическом кружке Дворца пионеров, преподавателем которого был замечательный педагог Виктор Власов. В этом же кружке, но в более поздние годы занимались и другие известные советские и российские химики, а также друзья и соратники Г.Б. Елякова: Зефиров Николай Серафимович и Оводов Юрий Семенович.

На следующей фотографии представлена оценка доклада участника 2-ой Научнотехнической конференции школьников РСФСР восьмиклассника Георгия Елякова на тему «Взрывчатые вещества».



В 1947 году Г.Б. Еляков окончил среднюю школу с серебряной медалью и поступил на химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. Интересно, что у Елякова Г.Б. и Зефирова Н.С. на Химфаке МГУ был один и тот же руководитель - профессор Ю.К. Юрьев.



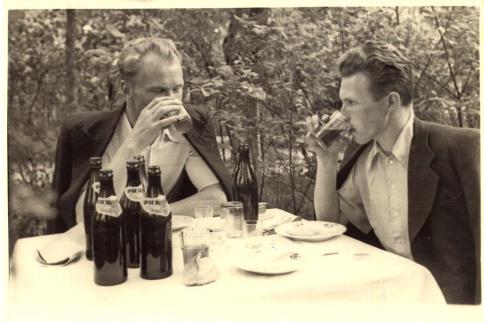
Студент-первокурсник Химфака МГУ, Волгострой, июль 1947 г.

Сначала студент Юра Еляков жил на квартире, но скоро получил койко-место в общежитии. Жили студенты в общаге дружно, очень скоро организовали коммуну: назначали двух дежурных на каждый день, которые готовили завтраки и ужины на всех. Студенты-москвичи, сначала смотревшие на общежитских свысока, потом стремились попасть в их компанию, в этом была и заслуга Юры Елякова – он тогда уже был лидером. Выпускники Химфака 1952 года устраивали встречи каждые 5 лет после окончания МГУ, Юру всегда очень ждали, но он после отъезда на Дальний Восток уже не всегда мог присутствовать на этих встречах.

Во время учебы папу очень поддерживал младший брат его мамы Алексей Николаевич Сиротин (дядя Леша), прошедший всю Великую Отечественную войну радистом на военном самолете. Когда он приезжал в Москву, то всегда старался

подкормить вечно голодных студентов (Юру и его друзей). На следующих двух фото – дядя и племянник.





Алексей Николаевич Сиротин и студент Юра Еляков, Москва



Алексей Николаевич Сиротин и Г.Б. Еляков, Ярославль, примерно 1952 г.

Во время учёбы в МГУ отец увлёкся стендовой стрельбой и фотографией. Ниже представлены 2 фото, сделанные моим отцом.



Школьница Галя Елякова



Алёнка Елякова – моя лучшая детская фотография (на ступеньках детского сада Ярославского шинного завода, во дворе дома № 18 на проспекте Ленина)

После окончания МГУ отец поступил в аспирантуру, занимался кремнийорганикой, руководителем его кандидатской диссертации был профессор Ю.К. Юрьев. Профессор Ю.К. Юрьев и аспирант Г.Б. Еляков были руководителями дипломной работы Беляковой Зои Васильевны (дочери родного брата бабушки отца), которую отец заразил любовью к химии. З.В. Белякова впоследствии всю свою научную деятельность занималась кремнийорганическими соединениями в ГНИИХТЭОСе, стала доктором химических наук,

Почетным химиком, автором многочисленных изобретений и до конца жизни сама проводила все экспериментальные работы. Отец дружил с ней до конца жизни.

Отец был заядлым и очень хорошим охотником. Далее представлены несколько фотографий, на которых Г.Б. Еляков на охоте в Центральной России, на Урале и на Дальнем Востоке.



Возле деревни Тетерино (которой уже давно нет) на границе Ярославской и Вологодской областей, 1956 год



Приполярный Урал, 1958 год (слева – М.П. Тепеницын)



На охоте с М.П. Тепеницыным, Долина Смерти (141 км Минского шоссе недалеко от Бородинского поля, здесь в 1941 г. была линия фронта), 1960 год

Там жила огромная стая тетеревов, и отец подстрелил тогда штук 6.



В тайге

Память о Георгии Борисовиче Елякове и его фотографии хранят ныне живущие Елякова Галина Борисовна (сестра), Сиротина Валентина Станиславовна (супруга А.Н. Сиротина), Хлыстова Ксения Борисовна (подруга по школе, химическому кружку и Химфаку), Тепеницын Михаил Павлович (друг юности и товарищ по охоте).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авилов С. А. – 27	Денисенко В. A. – 12, 29
Авраменко Т.В. – 90	Дмитренок П. С. – 7
Агафонова И. Г. – 56	Долматова Л. С. – 106
Александрова Г. П. – 86	Дышловой С. А.– 19, 29
Аминин Д. Л. – 20, 23, 87	Елисейкина М. Г. – 106
Анастюк С. Д. – 44, 97	Елякова E. Г. – 111
Антонов А.С. – 24	Еремеев В. И. – 40
Ануфриев В. Ф. – 17, 56	Ермак И. М 8, 37, 43, 50
Апанасевич В. И. – 67	Ермакова С. П. – 34, 38, 39, 48, 49, 88, 91,
Артюков А. А. – 12, 57	97, 98, 102, 104
Аулова К. С. – 14	Ершов П. В. - 79
Афиятуллов Ш. Ш. – 24, 75	Ефимова Е. Г. – 31
Бабкин В. А. – 59	Жиляева E. B. – 71
Бакунина И. Ю. – 59, 60	Журавлева О. И. – 24, 75
Балабанова Л. А. – 59, 60, 61, 66, 106	Задорожный П. А. – 62
Баланева Н. Н. –12, 69, 70, 73	Захаренко А. Л.– 21, 25
Балдаев C. H. – 100	Захарова О. Д. – 25
Бахолдина С. И. – 87	Звягинцев Н. В. – 104
Белик А. А. – 34	Звягинцева Т. Н. – 34, 38, 39, 49, 98, 104
Белоус О. С. – 59	Зелепуга Е. А.– 13, 41, 44, 47
Белоусова Е. Б. – 75	Зенкова М. А. – 71
Бердышев Д. В 12, 24, 76	Зуева А. О. – 49, 91
Бердышев Е. – 108	Иванец Е. В. – 31, 82
Билан М. И.– 15	Иванов А.С 9, 79
Благодатский А. С. – 80	Иванова В. П. – 109
Богданович Л. Н. – 50	Иванушко Л. А. – 38
Борисова К. Л.– 17	Иванчина H. B. – 26
Бородина А. В. – 62	Имбс Т. И. – 39
Бронова И. – 108	Исаева М. П. – 35, 40, 44, 89, 100, 101
Буйновская Н. С. – 61, 106	Исаков В. В. – 43
Булко Т. В. – 54	Иунихина О. В. – 28, 78
Быстрицкая Е. П. – 35, 100	Калина Р. С. – 41, 47
Васильева Е. А. – 12, 28, 77	Калинин В. И. – 27
Веселова М. В. – 30, 84	Калиновский А. П. – 40, 48, 96
Вознесенкский С. С. – 90	Калужский Л. A. – 79
Володько А. В. – 8, 37, 106	Кветкина А. Н. – 44, 47
Волчо К. П.– 21, 25	Ким Н. Ю. – 13, 87
Гаврюшина И. А. – 65	Киричук Н. Н. – 64
Гетман E. B. – 88	Киселева М. И. – 104
Гилеп А. А. – 54, 79	Кича А. А. – 26
Гирич A. C. – 36	Клименко A. M. – 80
Гладких И. Н. – 41, 44, 47, 96	Козловская Э. П. – 41, 44, 47, 57, 96
Глазунов В. П. – 8, 12, 43, 57, 70	Кокоулин М. С. – 42, 92, 93
Голева Е. – 108	Колесникова С. А. – 32
Горбач В. И. – 8	Компанец Г. Г. – 78
Горпенченко Т. Ю. – 87, 90	Кравченко А. О. – 8, 43, 50
Гузев К. В. – 89, 100	Крылова H. B. – 28, 78
Гузий А. Г.– 10	Куварина A. E. – 65
Гусев Е. И. – 58	Кудряшова Е. К.– 10
Давыдова В. Н. – 8, 37, 50	Кузиков А.В. – 54
Дегтяренко А. И. – 90	Кулеш Н. И. – 30
120	•

Купера Е. В. – 57 **Ракин А. В. - 35** Куриленко В. В. – 40, 89 Расин А. Б. – 48, 49 Кусайкин М. И. - 38, 48, 49 Родина Э. Е. – 95 Кухлевский А. Д. – 59, 105 Романенко Л. А. – 13, 42, 92,93 Лаврик О. И.- 21, 25 Рогожин Е. А. - 65 Лавров В. Ф. – 28 Руцкова Т. A. – 57 Лейченко Е. В. – 44, 47, 96 Сабуцкий Ю. Е.- 19, 20, 78, 83 Ленева И. А. - 28 Садриев К. А. – 36 Лизанов И. Н. – 42, 92, 93 Садыкова В. С. – 65 Салахутдинов Н. Ф. – 18, 21, 25, 71 Лихацкая Г. Н.– 13, 63 Логашенко Е. Б. - 71 Саломатина О. В. - 21, 71 Лузина О. А.- 18, 25 Сергеева Н. В. – 50 Лукьянов П. A. - 67Сейткалиева А. В. - 66 Льюнг Дональд – 108 Сидорин Е. В. – 88 Ляхова Е. Г. - 32 Сильченко А. (Александра) С. – 27 **Медков М. А.** – 67 Сильченко А. (Артем) С. – 34, 38, 39, 48, Макарьева Т. Н.- 10, 29, 34 49, 91 Синцова О. В. – 44, 47, 96 Маляренко O. C. – 38, 45, 88 Маляренко Т. В. – 26 Слепченко Л. В. - 60, 61, 66, 106 Марков A. B. – 71 Соколова Е. В. – 8, 42, 50, 77 Мартынов М. Ю. – 58 Соловьева Т. Ф. – 13, 87 Марченок M. B. – 66 Стенкова А. М. – 87 Macampex P. A. − 54 Стоник В. А. - 26 Маханьков В. В. – **57** Струшкевич Н. В. – 54 Мезенцев Ю. В. – 79 Суриц В. В. – 97 Мельман Г. И.- 17 Сухов Б. Г. – 51, 52, 86 Менчинская Е. С. - 20, 32, 81, 82, 87 **Табакмахер К. М.** – 10, 29, 34 Мизгина Т. O. - 46 Тананаев И. Г. – 67 Мищенко Н. П. – 12, 28, 77 Таракова О. В. – 67 Михайлов В. В. – 11 Тарбеева Д. В. – 30, 77, 80, 84 Молчанова В. И. – 46, 53 Текутьева Л. А. – 60, 61, 66 Монастырная М. М. – 41, 44, 47, 96 Терентьева Н. А. – 106 Набережных Г. А. – 94 Тимченко Н. Ф. – 106 Нагибко B. A. - 43 Трофимов Б. А. – 51, 52 Невинский Г. А.- 14 Тумилович А. М. - 79 Недашковская О. И. - 59, 105, 106 **Усанов С. А.** – 54, 79 Нифантьев Н. Э.- 15 Усов А.И. - 15 Новиков В. Л.– 12, 69 Усольцева Р. В. – 38, 88, 97, 98, 102 Новикова О. Д.- 13, 94, 95 Устюжанина Н. Е. – 15 Носкова Ю. А. - 61, 106 **Урусов** А. Е. – 14 Олейникова Г. К. – 24 Фалынскова И. Н. – 28 Федореев С. А. – 12, 28, 30, 77, 80, 84 Остроухова Л. А. – 58 **Панкратов Н. Р.** – 67 Филимонов А. С. - 18 Пелагеев Д. Н. – 17, 19 Фильштейн А. П. – 53, 67, 99 Пивкин М. В. – 64 **Хмелевская Е. А.** – 19 Пислягин Е. А. – 32, 81, 82 **Хмельков** А. Б. – 38 Подволоцкая А. Б. – 60 Хоменко В. А. - 13, 94 Полоник Н. С. - 83 Христенко В. С. - 61 Полоник С. Г. – 20, 78, 83 Худякова Ю. В. - 64 **Чаусова В. Е.** – 44, 100 Попадюк И. И. – 21 Попова Н. А. - 25 Черников О. В. - 46, 99 Попов Р. С. - 29 Черанева Д. М. - 60 Портнягина О. Ю. – 13, 95 Чернышева H. Ю. - 40, 89, 101

Чикаловец И. В. - 46, 53, 99

Чингизова Е. А. - 20

Чистюлин Д. К. - 13

Шевченко Л. С. – 20

Шевченко Н. М. – 97

Шестак О. П. – 12, 70, 72, 73

Шкель T. B. – 54

Шкрыль Ю. Н. – 60, 66, 90, 102

Шпрах В. В. – 58

Шубина Л. К. – 10

Шумянцева В. В. – 54

Шутикова А. Л. – 38

Эбралидзе Л. К. – 28

Югай Ю. А. – 66, 102

Юрченко А. Н. - 31, 81

Юрченко Е. А. – 31, 32, 81, 82

Яблоков Е. О. – 79

Jóhannes Reynisson – 22