

К 50-летию
Тихоокеанского института
биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

G.B. ELYAKOV PACIFIC INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY
OF FAR EASTERN BRANCH
OF RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

THE INVESTIGATIONS
OF NATURAL PRODUCTS
AT G.B. ELYAKOV
PACIFIC INSTITUTE
OF BIOORGANIC CHEMISTRY



Vladivostok
Dalnauka
2013

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Г.Б. ЕЛЯКОВА
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ТИХООКЕАНСКОМ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Г.Б. ЕЛЯКОВА



Владивосток
Дальнаука
2013

Исследования природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Владивосток: Дальнаука, 2013. 186 с.

В наше время, когда от ученых и научных коллективов требуют публикаций высокого научного качества, прежде всего, в журналах с высоким IF, появление сборника работ одного из ведущих институтов ДВО РАН может вызвать недоумение. Однако все становится на свое место, если обратить внимание на событие, которому посвящен этот сборник – пятидесятилетию Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Издание представляет своеобразный отчет коллектива перед научным сообществом. Основную часть сборника – 15 статей из 18, представляют обзоры литературы. Они посвящены различным классам природных соединений, изучающихся в институте – низкомолекулярным биорегуляторам, полисахаридам, ферментам, лектинам, а также исследованию биологической активности препаратов, относящихся к этим классам веществ. Как видно из библиографий к обзорам, их авторы демонстрируют не только хорошее знание мировой литературы по проблемам, но и внесли в их разработку собственный вклад, что повышает качество публикаций. Особое место в сборнике занимают статьи В.А. Стоника и Н.И. Стадниченко. Первая из них рассказывает о научных достижениях института за время его существования, оцененных мировым научным сообществом – цитировании публикаций в Web of Science. Вторая – документированный рассказ о достижениях института в прикладной области – о полученных его сотрудниками важнейших патентах. Сборника представляет интерес не только для отдельных групп специалистов, но найдет использование при подготовке студентов, магистрантов и аспирантов.

Издано по решению Ученого совета ТИБОХ ДВО РАН

Отв. редактор: д.х.н. *И.Н. Красикова*

Рецензент: чл.-корр., профессор *В.Е. Васьковский*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Этот сборник посвящен 50-летию Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН), который был создан в 1964 г. под названием Институт биологически активных веществ Сибирского Отделения АН СССР. Директором-основателем института был Георгий Борисович Еляков.

Г.Б. Еляков (1929–2005 гг.) – крупный ученый в области органической и биоорганической химии, талантливый организатор и многие годы руководитель академической науки на Дальнем Востоке России. С 1964 по 2001 гг. он был директором ТИБОХ ДВО РАН, с 1980 по 1986 гг. работал первым заместителем Председателя Президиума ДВО АН СССР, а с 1990 по 2001 гг. – Председателем ДВО РАН, членом Президиума и вице-президентом Российской академии наук. Г.Б. Еляков – автор более 260 научных статей и 50 патентов. Им опубликованы монографии: «Терпеноиды морских организмов» (в соавторстве с В.А. Стоником, 1986 г.); «Стероиды морских организмов» (в соавторстве с В.А. Стоником, 1988 г.); «Зостерин» (в соавторстве с Ю.Н. Лоевко, А.А. Артюковым, Э.П. Козловской и В.А. Мирошниченко, 1997 г.); «Морские микроорганизмы и их вторичные биологически активные метаболиты» (в соавторстве с В.В. Михайловым и Т.А. Кузнецовой, 1999 г.). В 2006 г. была учреждена премия ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, которая присуждается за выполненные на Дальнем Востоке России выдающиеся исследования в области органической и биоорганической химии.

История ТИБОХ ДВО РАН начиналась с исследований физиологически активных веществ из уникальных растений Дальнего Востока России. В это время были изучены гликозиды легендарного женьшеня, элеутерококка, нескольких других лекарственных растений Уссурийской тайги. Начались ботанические исследования, которые сейчас продолжаются в лаборатории хемотаксономии растений (акад. РАН П.Г. Горовой). Появились лаборатория микроанализа (к.х.н. Л.И. Глебко), лаборатория химии углеводов (акад. Ю.С. РАН Оводов, д.х.н. Т.Ф. Соловьева), лаборатория флоры и фауны моря (чл.-корр. РАН В.Е. Васильковский). Была создана экспериментальная база для структурных исследований биоактивных природных веществ физико-химическими методами, включая спектроскопию ЯМР и масс-спектрометрию (д.х.н. А.К. Дзизенко, к.х.н. В.В. Исаков, к.х.н. Ю.Н. Елькин). Активно изучались вещества плодородия – гуминовые кислоты (к.х.н. О.Б. Максимов). В лаборатории органического синтеза (д.х.н. Н.И. Уварова, д.х.н. В.Л. Новиков, д.х.н. В.Ф. Ануфриев) изучались проблемы синтеза гликозидов женьшеня и нафтохиноидных пигментов морских ежей.

С конца 60-х – начала 70-х гг. прошлого века морская тематика стала основной в институте. В бухте Троица на юге Приморья была организована и оборудована Морская экспериментальная станция (1967 г.). С 1973 г. начали работать в Мировом океане морские экспедиции, организованные институтом на НИС «Калисто», затем «Профессор Богоров», а с 1985 г. – на НИС «Академик Опарин», построенном и оборудованном в Финляндии для работ ТИБОХ. В институте стали активно развиваться прикладные работы, направленные на создание отечественных лекарственных препаратов, препаратов для сельского хозяйства и пищевой промышленности.

В последние 10–20 лет в институте были инициированы и успешно развиваются впечатляющие структурные исследования белков и пептидов (д.х.н. Э.П. Козловская, д.х.н. О.Д. Новикова и др.). Работы в области морской микробиологии, возглавляемые чл.-корр. РАН В.В. Михайловым, стали широко известны во всем мире. Несомненные успехи были достигнуты в молекулярной генетике и белковой инженерии (к.х.н. М.П. Исаева и др.), клеточной биологии и гликобиологии (д.х.н. П.А. Лукьянов и др.), энзимологии (д.х.н. Т.Н. Звягинцева, к.б.н. В.А. Рассказов и др.). В это же время были закончены разработки ряда лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище и организован их промышленный выпуск.

В настоящем сборнике представлены небольшие обзорные статьи, касающиеся целого ряда научных направлений института. Так, исследования низкомолекулярных морских природных соединений, представляющих интерес своими необычными структурами и биологическими активностями, обсуждаются в статьях д.х.н. Т.Н. Макарьевой «Двухголовые сфинголипиды морских губок», д.х.н. А.А. Кича с соавт. «Полярные стероиды морских звезд: структуры, биологическая актив-

ность, биосинтез», к.х.н. А.С. Сильченко с соавт. «Тритерпеновые гликозиды голотурий: химические структуры, биологическая активность и закономерности биосинтеза».

Механизмы и особенности физиологического действия такого рода веществ обсуждены в статьях к.б.н. Д.Л. Аминина с сотр. «Иммуномодулирующая активность тритерпеновых гликозидов голотурий», к.б.н. И.Г. Агафоновой «Создание экспериментальных моделей, изучение физиологических активностей препаратов методом МРТ», д.б.н. А.М. Попова «Биомедицинские свойства пептидов морских организмов и перспективы их использования», к.б.н. О.Н. Кривошапко с соавт. «Вторичные метаболиты морских организмов как корректоры нарушений липидного и углеводного обмена». В работе д.б.н. М.М. Анисимова с соавт. обсуждены опыт применения в растениеводстве и механизмы действия компонентов биопрепарата ДВ-47-4, разработанного в нашем институте. В статье д.б.н. А.В. Реунова с сотр. сообщается об исследованиях антивирусных свойств полисахаридных препаратов методом электронной микроскопии.

Работы Отдела молекулярной иммунологии представляет обзорная статья к.б.н. С.И. Бахолдиной с соавт. «Влияние абиотических факторов на формирование вирулентного фенотипа *Yersinia pseudotuberculosis*». В другой статье, подготовленной сотрудниками Отдела к.х.н. О.В. Черниковым с соавт., приведены научные данные о строении и свойствах представителей нового класса лектинов, выделенных из экстрактов мидий. Еще одна работа, представленная к.х.н. В.И. Молчановой с соавт., посвящена биологической активности Неомитилана, препарата, находящегося на этапе доклинического изучения и интересного своими иммуномодулирующими и ранозаживляющими свойствами. В работе М.С. Кокоулина с соавт. рассмотрены структуры и свойства некоторых *O*-специфических полисахаридов из морских грамотрицательных бактерий.

Исследования полисахаридов бурых водорослей и гидролизующих эти вещества ферментов обсуждаются в статье Т.Н. Звягинцевой и соавт. «Полисахариды бурых водорослей и ферменты морских организмов, катализирующие их превращения: перспективы создания БАД и лекарств на основе полисахаридов и продуктов их трансформации». В статье к.б.н. Н.А. Терентьевой и к.б.н. В.А. Рассказова «Нуклеозидкиназы морского ежа и их использование в биоиспытаниях» рассказывается о другой группе ферментов, которые участвуют в биосинтезе нуклеиновых кислот.

В сообщениях общего характера приводятся данные акад. РАН В.А. Стоника о наиболее цитируемых статьях института, к.х.н. Н.П. Красовской о работе Контрольно-аналитической лаборатории и начальника патентного отдела Н.И. Стадниченко о патентах сотрудников института.

В целом сборник может представить интерес для научных сотрудников, аспирантов и студентов, интересующихся проблемами и достижениями биоорганической химии, свойствами и строением природных соединений морского и наземного происхождения.

Директор ТИБОХ ДВО РАН,
акад. РАН
В.А. Стоник

О НАИБОЛЕЕ ЦИТИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ СТАТЬЯХ ИНБАВ-ТИБОХ ДВО РАН

В. А. Стоник¹

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 159*

В статье даны сведения о наиболее цитируемых работах сотрудников Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Приведено общее число статей, опубликованных и обработанных Web of Science, начиная с 1986 г., и их суммарное цитирование.

About the most quoted scientific articles of the G.B. Pacific Institute of Bioorganic Chemistry. *V. A. Stonik¹* (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

Short review on the most cited articles published by scientists of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry is given. Total number of scientific articles of the institute since 1986 as well as their total citation by Web of Science are reported.

ВВЕДЕНИЕ

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) был создан весной 1964 г. под названием Институт биологически активных веществ СО АН СССР (ИНБАВ СО АН СССР). В 1972 г. он был переименован и получил свое нынешнее название, хотя, естественно, он еще не носил тогда имя своего основателя – академика Георгия Борисовича Елякова, которому в то уже далекое время было 43 года, и он незадолго до этого защитил докторскую диссертацию. Только 2 года назад Институт стал «именным», и в его названии появилось соответствующее добавление.

За почти 50-летнюю историю в ИнБАВе-ТИБОХе было сделано немало выдающихся научных работ, о некоторых из них я попытаюсь рассказать в этом небольшом сообщении. При отборе материала о публикациях института приоритет отдавался тем научным статьям, которые имеют высокое цитирование в Web of Science (больше 50, начиная с 1986 г.), обеспечивающее тем самым знакомство с ними большого числа ученых, активно использовавших опубликованные в этих статьях данные в своей работе.

Известно, какое значение для науки имеет разработка новых методик. Хорошие методические работы обычно хорошо цитируются. Более того, ими пользуются тысячи ученых, чаще всего не ссылающиеся на них в своих публикациях. В 1968 г. молодые сотрудники ИнБАВа Виктор Евгеньевич Васьковский (в ту пору к.х.н., зам.

¹ Автор для связи (тел.: +7 (423) 231-16-51; эл. почта stonik@piboc.dvo.ru).

директора института, а ныне д.б.н., чл-корр. РАН) и Эдуард Яковлевич Костецкий (ныне д.б.н., профессор ДВФУ) разработали реагент для обнаружения фосфолипидов на тонкослойных хроматограммах. Соответствующая работа в «Journal of Lipid Research» [1] была процитирована более 450 раз и включена в список самых цитируемых работ Citation Classic. Этот реагент после дальнейшего усовершенствования стал известен среди липидологов под названием «реагент Васьковского».

К этой же категории методических работ относится статья В.Е. Васьковского и ныне д.б.н. Василия Ивановича Светашева о технике двумерной высокоэффективной тонко-слойной хроматографии полярных липидов, опубликованная в «Journal Chromatography» в 1972 г. [2] и процитированная с тех пор 150 раз. Высокоэффективная хроматография липидов по Васьковскому и Светашеву широко используется в ряде лабораторий мира.

В лаборатории химии ферментов нашего института был разработан простой метод выделения нейтральных водорастворимых полисахаридов с помощью гидрофобной хроматографии на Полихроме-1 (тефлоновом порошке, первоначально предложенном его разработчиками, латвийскими химиками-технологами, в качестве носителя для газо-жидкостной хроматографии). Соответствующая работа 1999 г. по выделению на этом сорбенте полисахаридов была процитирована по данным Web of Science более 80 раз, а при учете цитирования, приведенного в т.н. Российском индексе научного цитирования – около 100 раз [3].

Эта же лаборатория, возглавляемая сейчас д.х.н., профессором Татьяной Николаевной Звягинцевой, совместно с сотрудниками лаборатории д.х.н., чл-корр. РАН Юрия Анатольевича Щипунова из Института химии ДВО РАН разработала методики стабилизации ферментов-гидролаз путем их иммобилизации внутри золь-гель нанокомпозигов из кремниевой кислоты, содержащих полисахариды. Их статья была опубликована в «Journal of Biochemical and Biophysical Methods» за 2004 г. и процитирована около 60 раз [4]. Совместные исследования двух институтов ДВО РАН показали, что ферменты при такой иммобилизации не дезактивируются и остаются стабильными в течение долгого времени.

В ТИБОХ ДВО РАН еще в конце 70-х – начале 80-х гг. прошлого века был открыт уникальный фермент Са,Mg-ДНКазы из гепатопанкреаса камчатского краба (к.х.н. Наталья Ильинична Мензорова, к.б.н. Валерий Александрович Рассказов). Это была первая т.н. дуплекс-специфичная ДНКазы, т.е. нуклеаза, расщепляющая только двухцепочечные ДНК и практически неактивная в отношении одноцепочечных ДНК. Такие ферменты являются весьма полезными инструментами для молекулярной биологии и позволяют с помощью олигонуклеотидных зондов провести разрыв в любом заранее заданном «сайте» ДНК.

Позже к исследованиям этого фермента подключились сотрудники лаборатории д.б.н. (ныне академика РАН) Сергея Анатольевича Лукьянова из Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. В результате совместных исследований на основе применения этого фермента были разработаны метод обнаружения мононуклеотидных замен в ДНК, важный для генодиагностики различных заболеваний [5] (2002 г., около 80 цитирований), и, позже (2004 г.), – способ нормализации комплементарной ДНК [6] (более 150 цитирований).

В лаборатории морской биохимии нашего института под руководством к.б.н. В.А. Рассказова и сейчас проводится поиск и изучение ферментов с уникальной ак-

тивностью и/или специфичностью, интересных для медицины и биотехнологии. К их числу относится, например, щелочная фосфатаза из некоторых морских бактерий, по своей активности намного превосходящая ферменты этого подкласса из других биологических источников.

Компьютерное моделирование структуры и динамики биополимерных молекул, в особенности белков, было начато в нашем институте в 1980-х гг. группой к.ф.-м.н. Алексея Константиновича Мазура. Статья А.К. Мазура и Р.А. Абагяна из Института молекулярной биологии АН СССР, опубликованная в 1989 г. в «*Journal Biomolecular Structure Dynamics*» под названием «Новая методология для компьютерного моделирования структуры и динамики. 1. Нециклические структуры», была процитирована около 100 раз [7]. Другая статья этих же авторов [8] имеет около 60 цитирований. К сожалению, после крушения Советского Союза большинство сотрудников этой группы или покинули нашу страну, или стали заниматься бизнесом. Сам А.К. Мазур сейчас работает в Париже и является одним из ведущих французских ученых в области компьютерного моделирования. В нашем институте это направление долгое время развивалось к.ф.-м.н. Галиной Николаевной Лихацкой, недавно к нему подключились еще несколько ученых института. Сейчас компьютерное моделирование стало непременным атрибутом многих работ, выполняемых в ТИБОХ, в особенности при изучении различных белков и пептидов.

Исследования, связанные с выделением, установлением структуры и изучением биологической активности природных соединений, являются ведущим научным направлением с момента организации института. Долгое время они проводились под руководством академика Георгия Борисовича Елякова. В 1973 г. в журнале «*Comparative Biochemistry and Physiology*» была опубликована статья Г.Б. Елякова и сотрудников (более 50 цитирований) [9], в которой на основании достаточно простых экспериментальных данных было показано, что существует связь между структурными особенностями тритерпеновых гликозидов и таксономическим положением продуцентов этих веществ – голотурий, собранных в основном во время научной экспедиции на НИС «Академик Менделеев» в центральной части Тихого океана д.б.н. Валерием Семеновичем Левиным и др. Эта гипотеза была подтверждена дальнейшими структурными исследованиями, продолжающимися уже около 40 лет. При этом с применением данных о строении этих метаболитов было пересмотрено таксономическое положение целого ряда хорошо известных голотурий, в том числе дальневосточного трепанга.

Вопросы использования физиологически активных веществ из иглокожих в качестве хемотаксономических маркеров были рассмотрены также в 1988 г. в статье д.х.н., ныне академика РАН Валентина Ароновича Стоника и Г.Б. Елякова в серийном издании «*Bioorganic Marine Chemistry*» [10]. Статья имеет около 100 цитирований вместе с цитированиями, имеющими ошибки в библиографии.

Всего за время исследований вторичных метаболитов голотурий было выделено приблизительно 200 ранее неизвестных соединений этого класса, а суммарное цитирование соответствующих статей сотрудников института превышает 1250. Кроме вышеупомянутых, имеются и другие работы, посвященные гликозидам, которые процитированы более 50 раз, например работа 1999 г. В.А. Стоника, д.б.н. Владимира Ивановича Калинина и д.х.н. Сергея Анатольевича Авилова в «*Journal of Natural Toxins*» [11]. Среди тритерпеновых гликозидов голотурий найдено несколько веществ с впечатляющей физиологической активностью: иммуностимулирующей и проти-

воопухоловой. На протяжении ряда последних лет продолжается разработка нового отечественного лекарственного препарата «Кумазид» на основе этих исследований.

Несколько высоко цитируемых работ касаются изучения других структурных групп морских физиологически активных природных соединений. Эти работы также достаточно хорошо известны в среде химиков-биооргаников. К ним относятся, например, статья д.х.н. Татьяны Николаевны Макарьевой и сотр. о выделении и строении необычного высокосульфатированного стероида, названного сокотрастеринсульфатом, который оказался мощным активатором образования кровеносных сосудов (ангиогенеза). Статья вышла в журнале «Steroids» [12] и стала самой цитируемой из всех 193 научных статей, опубликованных в этом международном журнале в 1983 г.

Более 50 раз была процитирована работа д.х.н. Аллы Анатольевны Кича, к.х.н. Элеоноры Викторовны Левиной и других [13] о выделении и структуре астеросапонина P1 из морской звезды *Patiria pectinifera*. Это стероидное соединение было одним из первых представителей соответствующей структурной группы морских полярных стероидов. Хорошо цитируется и обзорная статья 2001 г. В.А. Стоника о морских полярных стероидах в журнале «Успехи химии» (около 60 цитирований) [14]. Всего в лаборатории химии морских природных соединений института было выделено около 500 новых вторичных метаболитов, главным образом морского происхождения, в том числе стероиды, терпеноиды, алкалоиды, гликозиды, необычные липиды, вещества иной химической природы. Некоторые из них привлекают внимание своими свойствами и физиологическими активностями.

В последние годы в лаборатории неинфекционного иммунитета по инициативе д.х.н. профессора Павла Александровича Лукьянова развивается тематика, связанная с лектинами. Эти биополимеры, распознающие определенные углеводные фрагменты, распространены в различных животных и растениях. Так называемые галектины, относящиеся к одной из групп лектинов, принимают участие в функционировании иммунной системы человека, клеточном делении и участвуют в опухолевом развитии. Обзорная статья П.А. Лукьянова и сотрудников МХОРПИ Медицинского колледжа, США, под названием «Внеклеточные функции галектина-3» была опубликована в «Glycoconjugate Journal» (2004 г.) и к настоящему времени процитирована около 120 раз [15]. Лектинная тематика в ТИБОХ ДВО РАН успешно развивается, имеются хорошие перспективы создания на этой основе новых диагностических методов для медицины.

Целая серия прекрасных работ была подготовлена сотрудниками лаборатории морской микробиологии во главе с д.б.н., член-корр. РАН Валерием Викторовичем Михайловым. Наиболее цитируемая из этих работ – статья д.б.н. Елены Петровны Ивановой и др., посвященная филогении морских *Alteromonas*-подобных бактерий с выделением из этой группы 7 новых семейств [16]. Новые семейства бактерий описываются редко, а с участием российских микробиологов случаев описания такого большого числа новых семейств до этой работы не было. Статья была опубликована в «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology» в 2004 г., и с тех пор процитирована около 100 раз. В другой статье Е.П. Ивановой и сотр. в этом же научном журнале, процитированной около 80 раз [17], были рассмотрены вопросы фенотипического разнообразия морской бактерии *Pseudoalteromonas citrea*. Еще несколько высокоцитируемых работ, посвященных изучению бактерий родов *Alteromonas* и *Pseudoalteromonas* и их метаболитов, были опубликованы Е.П. Ивановой, В.В. Михайловым и др. в 90-е гг. [18, 19]. Сотрудники этой лаборатории описали также новый

род *Idiomarina* и 2 принадлежащих к нему вида бактерий [20] (55 цитирований). Всего в этой лаборатории описано более 100 новых видов и надвидовых таксонов морских бактерий.

Интересная статья, посвященная полногеномному секвенированию продуцирующей родопсин морской флавобактерии *Polaribacter* sp. была подготовлена группой ученых из разных стран с участием д.б.н. Ольги Ильиничны Недашковской. Опубликованная совсем недавно, в 2008 г., в «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», она уже имеет более 60 цитирований [21]. Около 60 раз процитирована работа О.И. Недашковской и сотр. с описанием бактерий нового рода *Reichenbachia* [22], около 50 раз – нового рода *Mesonina* [23], названного в честь Морской экспериментальной станции нашего института, в водах которой такие бактерии были найдены.

В начале 90-х гг. была опубликована работа о 2-х новых рибонуклеазах, сходных с белками, которые образуются в растениях при грибковой инфекции. Эти рибонуклеазы были найдены в каллусной культуре женьшеня к.х.н. Ларисой Ивановной Федоревой. Определение аминокислотных последовательностей доказало, что белки, экспрессирующиеся при инфекционном поражении в растениях, на самом деле являются рибонуклеазами (журнал «Planta», 1994 г.) [24]. Эта и последующая [25] работы Л.И. Федоревой выполнялись совместно с сотрудниками Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, акад. РАН Юрием Николаевичем Журавлевым (Биолого-почвенный институт ДВО РАН) и голландскими биохимиками и были процитированы каждая по 90 раз.

Несколько привлечших внимание работ были выполнены в лаборатории химии углеводов и липидов нашего Института. К ним, например, относится описание структуры необычного фосфорилированного полисахарида из бактерии *Shewanella putrefasciens* группой сотрудников во главе с к.х.н. Раисой Петровной Горшковой в международном научном журнале «Carbohydrate Research» в 1997 г. [26] (около 70 цитирований).

Сравнительно недавно было показано, что многие физиологически активные соединения, ранее выделенные из морских беспозвоночных, имеют, на самом деле, микробиальное происхождение. В их биосинтезе участвуют симбионтные микроорганизмы, обитающие в этих животных. Одна из первых работ, экспериментально подтвердивших эту гипотезу, была выполнена в нашем институте в 1991 г. во время морской экспедиции на НИС «Академик Опарин». Ее авторами стали сотрудники лаборатории микробного биосинтеза во главе с ее в то время заведующей к.х.н. Татьяной Алексеевной Кузнецовой вместе с д.б.н. В.В. Михайловым, д.х.н. С.А. Федоревым и к.ф.-м.н. Валерием Геннадьевичем Воиновым (ныне работает в США) [27]. Они установили, что морские бактерии *Vibrio* sp. из губки *Dysidea* sp. биосинтезируют бромированные дифениловые эфиры с противомикробными свойствами. Эта работа к настоящему времени процитирована около 65 раз. Следует заметить, что исследования физиологически активных метаболитов морских микроорганизмов до сих пор интенсивно проводятся в институте, сейчас под руководством к.х.н. Шамила Шарбияновича Афиятуллова.

Природные соединения из наземных высших растений и их клеточных культур изучаются в лаборатории химии природных хиноидных соединений, которая сотрудничает с коллегами из Биолого-почвенного института ДВО РАН. Несколько работ

д.х.н. Сергея Александровича Федореева и д.б.н., член-корр. РАН Виктора Павловича Булгакова (БПИ ДВО РАН) с сотр., развивающих это научное направление, хорошо цитируются. К ним относится, например, статья, посвященная эффекту салициловой кислоты, метил жасмоната и других веществ на продукцию антрахиноновых метаболитов генетически трансформированными каллусными культурами *Rubia cordifolia* (2002 г., более 60 цитирований) [28], и работа 2007 г. в «Journal of Biotechnology» о содержании известного антиоксиданта резвератрола в каллусных культурах амурского винограда *Vitis amurensis* [29] (около 50 цитирований). Широко известны и прикладные результаты этой лаборатории, достигнутые в 80-ые – в начале 90-х гг. прошлого века под руководством к.х.н. Олега Борисовича Максимова. Тогда были разработаны лекарственные препараты «Гистохром для офтальмологии», «Гистохром для кардиологии» и «Максар», для создания технологий производства и организации выпуска которых потребовалось еще много лет тяжелой работы.

Можно отметить немало других хороших работ сотрудников ТИБОХ, цитируемых лишь немногим реже, чем те статьи, которые упомянуты выше. К ним относятся некоторые работы лаборатории органического синтеза природных соединений (руководитель д.х.н. Виктор Филиппович Ануфриев), например, статья по синтезу и кардиопротекторным свойствам гидроксилированных нафтазариновых производных, опубликованная в 1998 г. [30]. Неплохо цитируются работы д.х.н. Т.Н. Макарьевой, в частности, работы по выделению и свойствам новых полисульфидов вараценовой серии из асцидий [31], недавняя совместная статья сотрудников Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН (д.х.н. Э.П. Козловская, д.х.н. М.М. Монастырская), посвященная пептидам из актиний, обладающим обезболивающими свойствами [32], а также некоторые другие работы института.

Всего за период с 1986 г. по настоящее время базой данных Web of Science обработано около 1900 научных статей нашего института с суммарным цитированием приблизительно 12800. Среднее цитирование на 1 такую статью за этот период составляет около 6.8. В 2012 г. ежегодное цитирование научных статей сотрудников ТИБОХ ДВО РАН превысило отметку 1250. Статистика показывает, что наш институт является самым цитируемым из всех научных учреждений Дальнего Востока России. Это обстоятельство отражено и подтверждается на сайте <http://www.scientific.ru>, где приведены сведения обо всех наиболее цитируемых ученых нашей страны и их распределении по городам и учреждениям.

Интересно, что около половины от хорошо цитируемых работ, упомянутых в настоящем сообщении, были подготовлены вместе с сотрудниками других институтов ДВО РАН (Биолого-почвенного института, Института химии и Института биологии моря) или совместно с московскими учеными (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта), а также с зарубежными коллегами из США, Японии, Австралии, Республики Корея, других стран. Это свидетельствует о том, какую важную роль играет сейчас научное сотрудничество, позволяющее, используя взаимные возможности, выполнять исследования на высоком научном уровне.

Другое важное обстоятельство, связанное с высоко цитируемыми работами ИНБАВ-ТИБОХ, состоит в том, что все они, за одним исключением, были опубли-

кованы в международных научных изданиях. В самом деле, такие научные журналы имеют широкий круг читателей и входят в фонды многих тысяч научных библиотек по всему миру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms // J. Lipid Res. 1968. V. 9. P. 396.
2. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr. 1972. V. 67. P. 376–378.
3. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. P. 32–39.
4. Shchipunov Ju.A., Carpenko T.Y., Bakunina L.Y., Burtseva Y.V., Zvyagintseva T.N. A new precursor for the immobilization of enzymes inside sol-gel-derived hybrid silica nanocomposites containing polysaccharides // J. Biochem. Biophys. Meth. 2004. V. 58. P. 25–38.
5. Shagin D.A., Rebrikov D.V., Kozhemyako V.B., Altshuler I.M., Shcheglov A.S., Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Staroverov D.B., Rasskazov V.A., Lukyanov S.A. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1935–1942.
6. Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Shcheglov A.S., Vagner L.L., Khaspekov G.L., Kozhemyako V.B., Matz M.V., Melishkevitch E., Moroz L.L., Lukyanov S.A., Shagin D.A. Simple cDNA normalization using Kamchatka crab duplex-specific nuclease // Nucl. Acid. Res. 2004. V. 32. P. e37.
7. Mazur A.K., Abagyan R.A. New methodology of computer-aided modeling of biomolecular structure and dynamics. 1. Non-cyclic structures // J. Biomol. Struct. Dynamics. 1989. V. 6. P. 815–832.
8. Mazur A.K., Abagyan R.A. New methodology of computer-aided modeling of biomolecular structure and dynamics. 2. Local deformations and cycles // J. Biomol. Struct. Dynamics. 1989. V. 6. P. 833–845.
9. Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V., Slanke V.P., Levin V.S. Glycosides of marine invertebrates. I. A comparative study of the glycoside fractions of Pacific sea cucumbers // Comp. Biochem. Physiol. 1973. V. 44B. P. 325–336.
10. Stonik V.A., Elyakov G.B. Secondary metabolites from echinoderms as chemotaxonomic markers // Bioorg. Mar. Chem. V. 1988. V. 2. P. 43–86.
11. Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A. Toxins from sea cucumbers (holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution // J. Nat. Toxins. 1999. V. 8. P. 235–248.
12. Makarieva T.N., Shubina L.K., Kalinovskiy A.I., Stonik V.A., Elyakov G.B. Steroids in Porifera. 2. Steroid derivatives from 2 sponges of the family Halichondriidae – sokotrasterol sulfate, a marine steroids with new pattern of side-chain alkylation // Steroids. 1983. V. 43. P. 267–281.
13. Kicha A.A., Kalinovskiy A.I., Levina E.V., Stonik V.A., Elyakov G.B. Asterosaponin P1 from the starfish *Patiria pectinifera* // Tetrahedr. Lett. 1983. V. 24. P. 3893–3896.
14. Стоник В.А. Морские полярные стероиды // Усп. химии. 2001. V. 70. P. 763–808 (англ. версия: Stonick V.A. or Stonik V.A., Russ. Chem. Revs. 2001. 70. P. 673–713).
15. Ochieng J., Furtak V., Lukyanov P. Extracellular function of galectin-3 // Glycoconjugate J. 2004. V. 19. P. 527–535.
16. Ivanova E.P., Flavier S., Christen R. Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Montellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiology 2004. V. 54. P. 1773–1778.
17. Ivanova E.P., Kiprianova E.A., Mikhailov V.V., Levanova G.F., Garagulya A.D., Gorshkova N.M., Vysotskii M.V., Nicolau D.V., Yumoto N., Taguchi T., Yoshikawa S. Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas*

citrea from different marine habitats and emendation of the description // Int. J. Syst. Evol. Microbiology 1998. V. 48. P. 247–256.

18. Ivanova E.P., Kiprianova E.A., Mikhailov V.V., Levanova G.F., Garagulya A.D., Gorshkova N.M., Yumoto N., Yoshikawa S. Characterization and identification of marine *Alteromonas nigrifaciens* strains and emendation of the description // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1996. V. 46. P. 223–228.

19. Svetashev V.I., Vysotsky M.V., Ivanova E.P., Mikhailov V.V. Cellular fatty acids of *Alteromonas* species // Syst. Appl. Microbiol. 1996. V. 18. P. 37–43.

20. Ivanova E.P., Romanenko L.A., Chun J., Matte M.H., Matte G.R., Mikhailov V.V., Svetashev V.I., Huq A., Mangel T., Colwell R.R. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 901–907.

21. Gonzalez J.M., Fernandez-Gomez B., Fernandez-Guerra A., Gomez-Consarnau L., Sanchez O., Coll-Llado M., del Campo J., Escudero L., Rodriguez-Martinez R., Alonso-Saez L., Latasa M., Paulsen I., Nedashkovskaya O.I., Lekunberri I., Pinhassi J., Pedros-Alio C. Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 8724–8729.

22. Nedashkovskaya O.I., Suzuki M., Vysotskii M.V., Mikhailov V.V. *Reichenbachia agariperforans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003 V. 53. P. 81–85.

23. Nedashkovskaya O.I. Kim S.B., Han S.K., Lysenko A.M., Rohde M., Zhukova N.V., Falsen E., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Bae K.S. *Mesonina algae* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the green alga *Acrosiphonia sonderi* (Ku.tz) Kornm. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1967–1971.

24. Moiseev G.P., Beintema J.J., Fedoreeva L.I., Yakovlev G.I. High sequence similarity between a ribonuclease from Ginseng calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases // Planta. 1994. V. 193. P. 470–472.

25. Moiseev G.P., Fedoreyeva L.I., Zhuravlev Y.N., Yasnetskaya E., Jekel P.A., Beintema J.J. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses – New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins // FEBS Lett. 1997. V. 407. P. 207–210.

26. Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Nazarenko E.L., Zubkov V.A., Gorshkova N.M., Knirel Y.A., Gorshkova R.P. Structure of a phosphorylated polysaccharide from *Shewanella putrefaciens* strain S29 // Carbohydr. Res. 1997. V. 303. P. 333–338.

27. Elyakov G.B., Kuznetsova T., Mikhailov V.V., Maltsev I.I., Voinov V.G., Fedoreev S.A. Dibrominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. // Experientia. 1991. V. 47. P. 632–633.

28. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone products on by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes // J. Biotechn. 2002. V. 97. P. 213–221.

29. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // J. Biotechn. 2007. V. 97. P. 213–221.

30. Anufriev V.P., Novikov V.L., Maximov O.B., Elyakov G.B., Levitsky D.O., Lebedev A.V., Sadretdinov S.M., Shvilkin, A.V., Afonskaya N.I., Ruda M.Y., Cherpachenko N.M. Synthesis of some hydroxynaphthazarins and their cardioprotective effects under ischemia-reperfusion *in vivo* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998. V. 8. P. 587–592.

31. Makarieva T.N., Stonik V.A., Dmitrenok A.S., Grebnev B.B., Isakov V.V., Rebachuk N.M., Rashkes Y.W. Varacin and 3 new marine antimicrobial polysulfides from the Far-eastern ascidian *Polycitor* sp. // J. Nat. Prod. 1995. V. 58. P. 254–258.

32. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 23914–23921.

ПОЛЯРНЫЕ СТЕРОИДЫ МОРСКИХ ЗВЕЗД: СТРУКТУРЫ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, БИОСИНТЕЗ

А. А. Кича¹, Н. В. Иванчина, Т. В. Маляренко

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

Обсуждены структуры новых полярных стероидов из семи видов морских звезд и новые данные по биологической активности и биосинтезу этих соединений, полученные в течение последних 5-6 лет.

Ключевые слова: полигидроксистероиды, стероидные гликозиды, биологическая активность, биосинтез, морские звезды.

Polar steroids from starfish: structures, biological activity, biosynthesis. A. A. Kicha¹, N. V. Ivanchina, T. V. Malyarenko (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Russia).

Structures of new polar steroids isolated from seven species of starfish and new data on biological activity and biosynthesis of these steroid compounds obtained over the last 5-6 years are discussed.

Keywords: polyhydroxysteroids, steroid glycosides, biological activity, biosynthesis, starfish.

ВВЕДЕНИЕ

Морские звезды (класс Asteroidea, тип иглокожие – Echinodermata) содержат разнообразные по своему химическому строению полярные стероиды, которые значительно отличаются от стероидных метаболитов других животных и наземных растений, в том числе от других стероидов морского происхождения [1-6]. К полярным стероидным соединениям морских звезд принято относить астеросапонины – олигогликозиды с 5-6 моносахаридными остатками и 3-О-сульфатированными $\Delta^{9(11)}$ -3 β ,6 α -дигидроксистероидными агликонами, полигидроксистероиды, чаще всего имеющие от 4 до 9 гидроксильных групп, и многочисленные гликозиды полигидроксистероидов (монозиды, биозиды, иногда триозиды). Нередко полигидроксистероиды и структурно родственные им гликозиды встречаются в виде моносulfатов. Подобные полярным стероидам морских звезд соединения не найдены в других классах иглокожих (Crinoidea, Ophiuroidea, Echinoidea, Holothurioidea), поэтому они могут служить своеобразными таксономическими маркерами класса Asteroidea.

Чем же можно объяснить присутствие в организме этих животных таких соединений? Известно, что большинство морских звезд являются активными хищниками.

¹ Автор для связи (тел.: (423) 231-11-68; эл. почта: kicha@piboc.dvo.ru).

Вероятно, именно с типом питания связаны особенности строения органов пищеварения морских звезд, имеющих желудок и пилорические выросты (гепатопанкреас). В отличие от морских звезд у других классов иглокожих гепатопанкреас отсутствует. Наряду с полостным перевариванием в желудке для морских звезд характерно внутриклеточное переваривание, которое происходит в пилорических выростах. Ранее на примере дальневосточной морской звезды *Patiria pectinifera* мы показали, что полигидроксистероиды и их гликозиды локализуются в основном в пищеварительных органах, преимущественно в гепатопанкреасе, выполняя, очевидно, роль эмульгирующих агентов, подобно желчным спиртам и кислотам у животных, стоящих на более высоких ступенях развития [7]. В то же время, астеросапонины были локализованы в основном в стенках тела и гонадах животных, выполняя, вероятно, защитные функции и принимая участие в регуляции гаметогенеза [7].

Научный интерес к полярным стероидным соединениям морских звезд объясняется как их оригинальным химическим строением, так и разнообразными биологическими свойствами, включая эмбриотоксическую, антигрибковую, противовирусную, противоопухолевую и другие виды активности [1-6]. Недавно нами было показано, что некоторые стероидные гликозиды морских звезд препятствуют перерождению нормальных клеток в опухолевые (канцерпревентивный эффект) [8] и тормозят образование колоний опухолевых клеток (противоопухолевый эффект) [9-12]. Кроме того, стало также известно, что многие из этих соединений подобно нейротрофинам могут проявлять нейротрофические и нейропротекторные свойства [13-14].

В представленной работе мы обсуждаем результаты структурных исследований полярных стероидов из морских звезд и новые данные относительно их биологической активности и биосинтеза, которые были получены нами в течение последних 5-6 лет.

ПОЛЯРНЫЕ СТЕРОИДЫ МОРСКИХ ЗВЕЗД

Нами был изучен стероидный состав 2-х видов тропических морских звезд (*Archaster typicus* [15–17] и *Asteropsis carinifera* [10, 11, 18]), собранных у побережья Вьетнама, и 4-х дальневосточных видов (*Hippasteria kurilensis* [9, 19–21] и *Leptasterias fisheri* [22], собранных в Охотском море у побережья Курильских островов, *Lethasterias fusca* [12] и *Aphelasterias japonica* [23], собранных в заливе Посыет Японского моря). Кроме того, мы изучили метаболиты *Diplasterias brucei*, собранной у побережья Антарктиды [24]. В результате было выделено 82 полярных стероидных метаболита, из них 38 веществ оказались новыми, ранее неописанными в научной литературе.

Выделение полярных стероидов. Выделение индивидуальных соединений – это важный этап на пути к установлению строения полярных стероидных метаболитов морских звезд. Однако получение индивидуальных компонентов является весьма трудной экспериментальной задачей. В большинстве случаев данные соединения присутствуют в виде сложных смесей структурно близких веществ. Кроме того, процесс выделения усложняет присутствие многочисленных полярных соединений нестероидной природы (пептидов, липидов, алкалоидов и др.), от которых удается избавиться иногда только на последних этапах хроматографического разделения после применения высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на различных

сорбентах. В качестве примера на схеме 1 показано выделение стероидных метаболитов из *A. carinifera*.

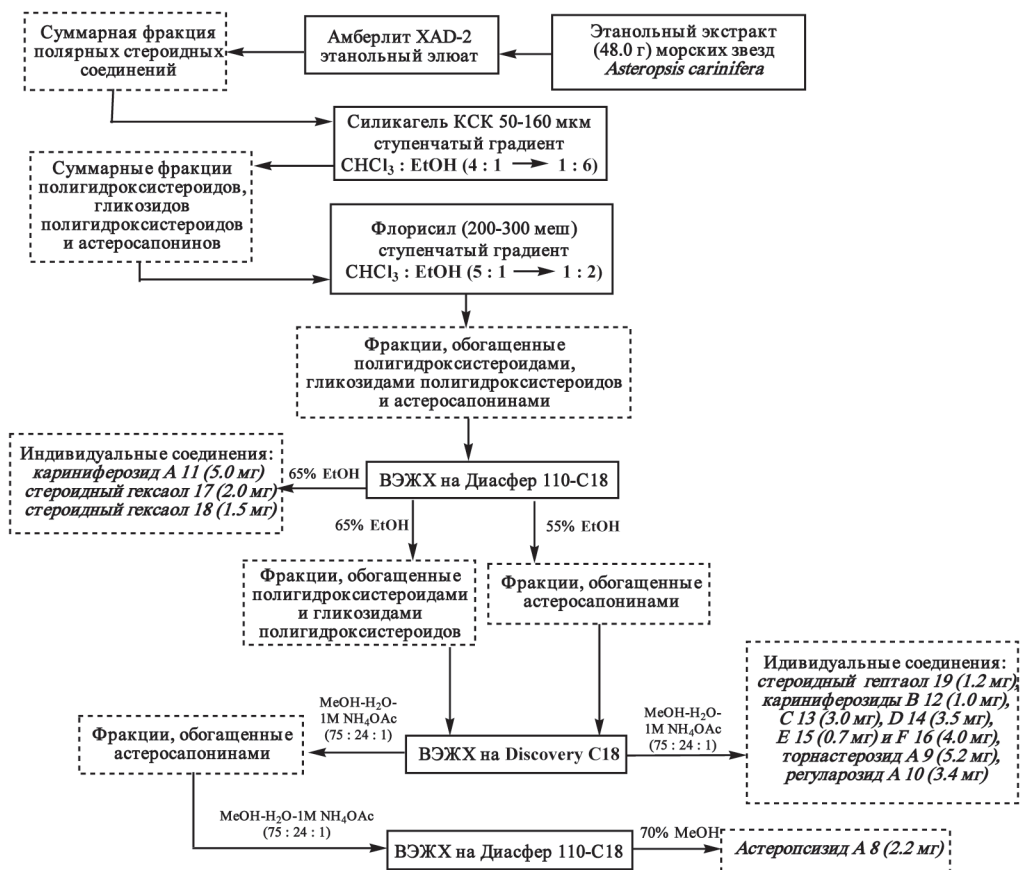


Схема 1. Выделение стероидных метаболитов из *Asteropsis carinifera*

Установление строения полярных стероидов. Структуры новых веществ были установлены в основном с помощью экспериментов одно- и двумерной спектроскопии ЯМР (DEPT, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC, NOESY, H2BC и 1D TOCSY), масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI), включая tandemную масс-спектрометрию, и химических трансформаций. В качестве примера на рис. 1 показано определение места присоединения олигосахаридной цепи к агликону и положений гликозидных связей в моносахаридных остатках гиппастериозидов A-D (1–4) с помощью HMBC и NOESY экспериментов.

Важная структурная информация была получена в результате изучения масс-спектрометрической фрагментации полярных стероидных соединений (рис. 2). Отношение моносахаридных остатков в стероидных гликозидах к *D*- или *L*-ряду проводили с помощью кислотного гидролиза гликозидов с последующим получением оптически активных ацетатов октил-производных моносахаридов и ГЖХ анализом этих производных (рис. 3).

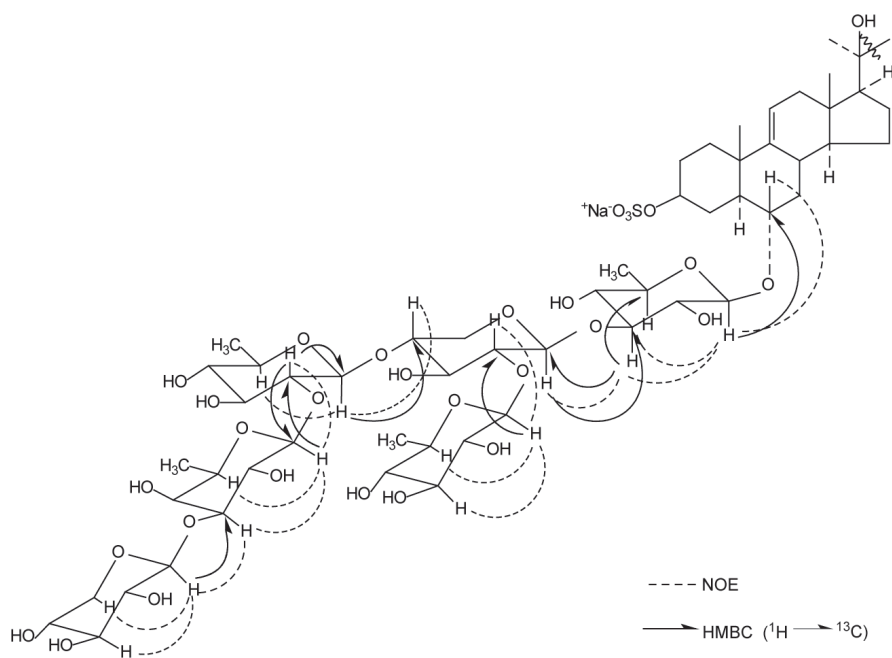


Рис. 1. Основные NOESY и HMBC корреляции для углеводной цепи гипастериозидов A-D (1–4)

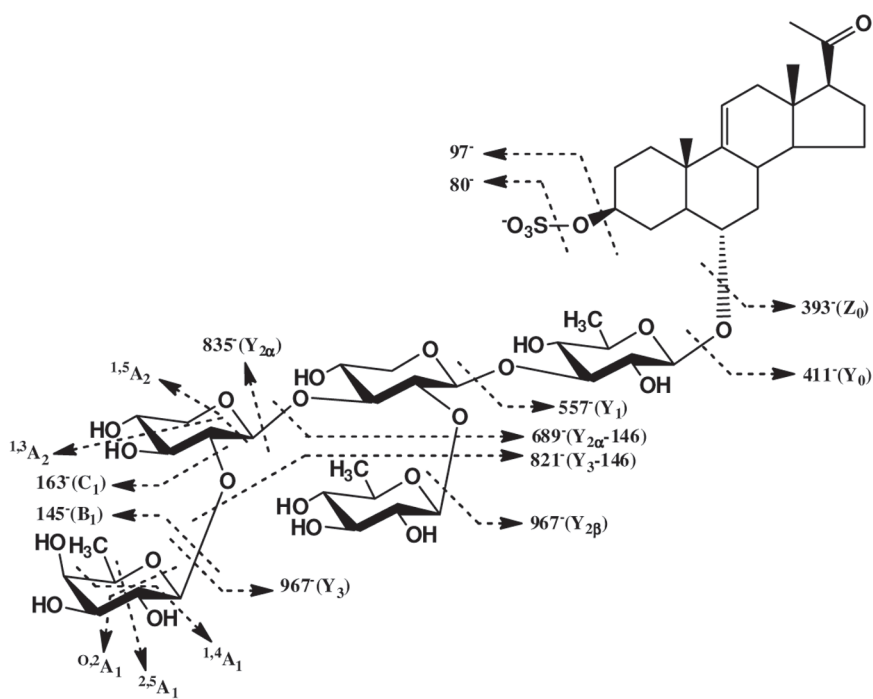


Рис. 2. Схема фрагментации астеронового аналога офидианозида F (5) в (–) ESI MS/MS спектре

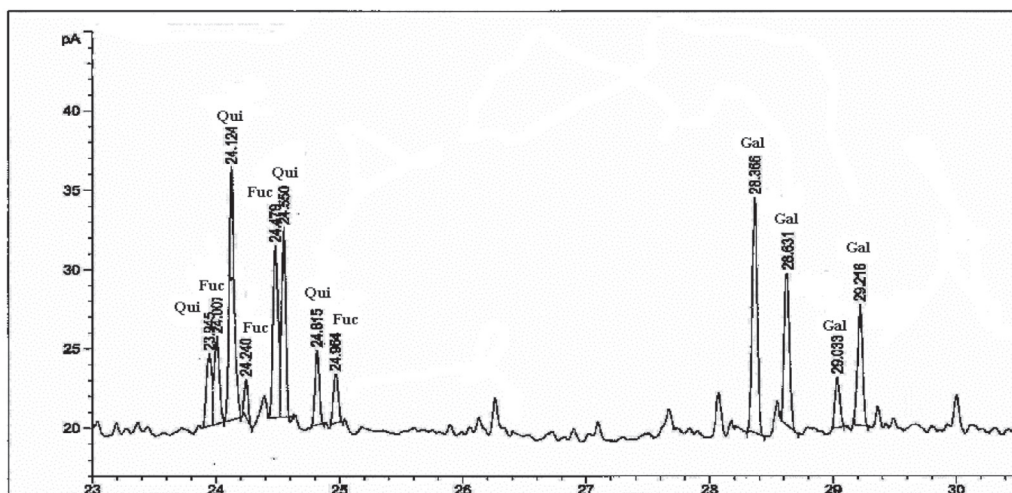
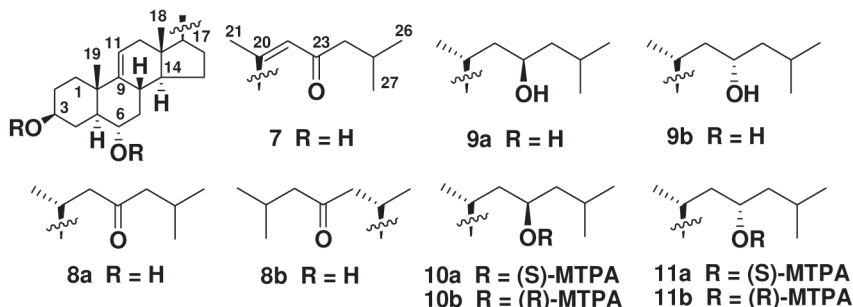


Рис. 3. ГЖХ хроматограмма оптически активных ацетатов октилглюкозидов, полученных после гидролиза дипластериозида В (6)

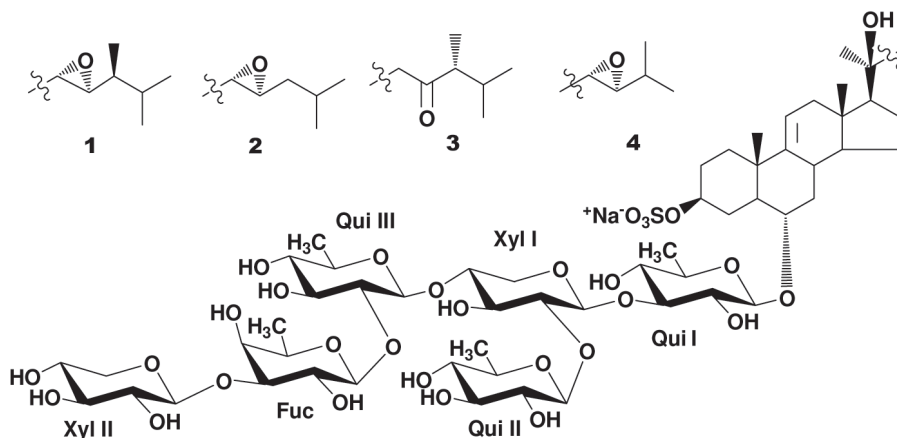
Нередко астеросапонины содержат (20*R*)-23-гидроксистероидные боковые цепи с дополнительным асимметрическим центром при С-23. Определение абсолютной конфигурации асимметрических центров в боковых цепях новых астеросапонинов является весьма важной задачей. В тех случаях, когда такие соединения получены в минорных количествах, например, менее чем 1 мг, применение традиционного метода Мошера для вторичных спиртов, основанного на получении оптически активных *S*-(–) и *R*-(+)- α -метокси- α -(трифторметил)-фенилацетил (МТРА) эфиров, для установления абсолютной конфигурации С-23 является либо невозможным, либо довольно затруднительным. Поэтому мы предложили метод установления абсолютной конфигурации С-23 в (20*R*)-23-гидроксистероидных боковых цепях стероидных соединений с помощью спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и сравнения спектров со спектрами модельных соединений [25].

В результате восстановления двойной связи в боковой цепи изомартастерона (7) и последующего восстановления карбонильной группы в эпимере **8a** были получены эпимерные (20*R*,23*R*)- и (20*R*,23*S*)-23-гидроксистероидные стероиды **9a** и **9b**. Их структуры были изучены с помощью методов двумерной ЯМР спектроскопии (^1H - ^1H COSY-45, HSQC, HMBC и NOESY) и метода Мошера с получением оптически активных (*S*)- и (*R*)-МТРА эфиров **10a**, **10b** и **11a**, **11b**.



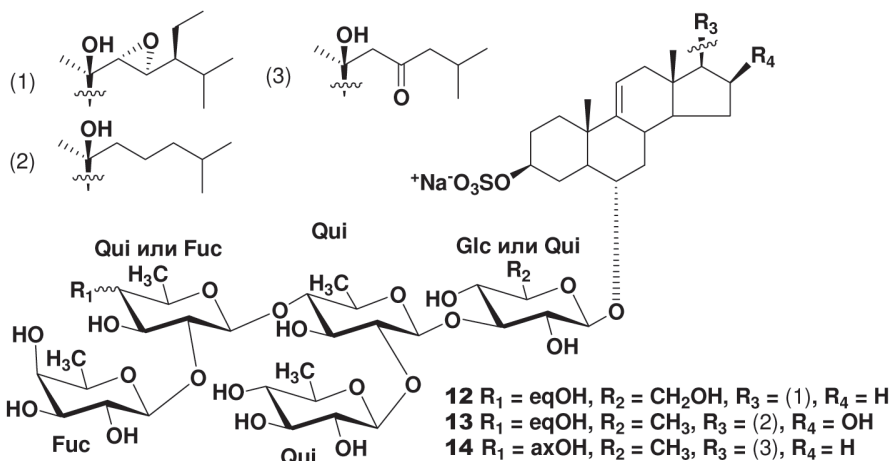
Все сигналы протонов и атомов углерода боковых цепей соединений **9a** и **9b** были установлены. Показано, что большинство этих сигналов значительно отличаются друг от друга в зависимости от конфигурации атома С-23. Полученные значения химических сдвигов протонов и атомов углерода для модельных соединений **9a** и **9b** позволяют определять конфигурацию асимметрического центра С-23 в (20*R*)-23-гидроксистероидных боковых цепях новых природных стероидов на основании сравнительного анализа их спектральных данных. В результате была установлена С-23 конфигурация двух стероидных соединений из морских звезд *Lethasterias nanimensis chelifera* и *Lethasterias fusca* [25].

Ниже приведены примеры новых полярных стероидов, наиболее интересных с точки зрения оригинальности их химического строения. Так, исследование этанольного экстракта морской звезды *H. kurilensis* привело к выделению четырех новых астеросапонинов – гиппастериозидов (**1–4**) [9]. Гексазиды **1–4** содержат новый вариант углеводной цепи, ранее не встречавшийся в астеросапонидах. В самом деле, β-*D*-ксилопираноза очень редко встречается в качестве терминального моносахарида в углеводных цепях других астеросапонинов.

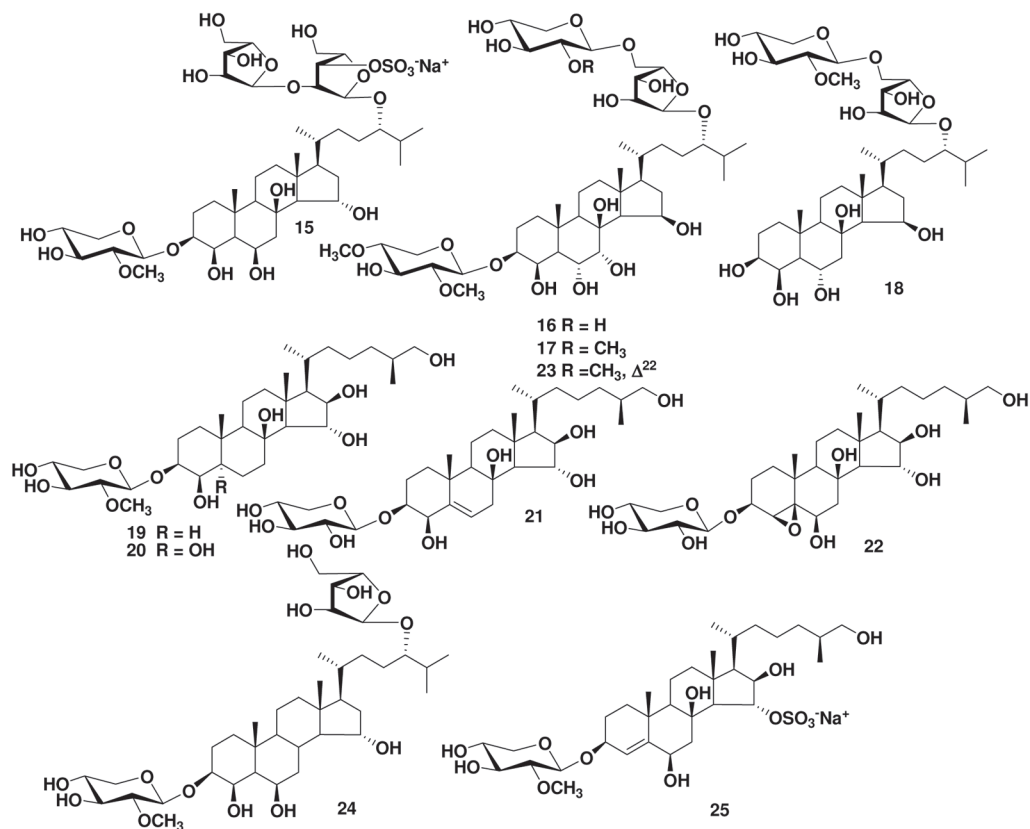


В стероидной фракции *A. typicus* было найдено 3 астеросапонида – архастерозиды А-С (**12–14**) [15, 16]. В гликозиде **12** впервые для астеросапонинов обнаружена (20*R*,24*S*,22*R*,23*S*)-20-гидрокси-22,23-эпоксистероидная боковая цепь. Оригинальность структуры соединения **13** заключается в том, что она, в отличие от остальных представителей этой группы веществ, имеет свободную гидроксильную группу при С-16 стероидного агликона. В соединениях **13** и **14** содержится олигогликозидная цепь, состоящая только из остатков 6-дезоксигексоз – β-*D*-фукопиранозы и β-*D*-хиновопиранозы. Такое преобладание дезоксисахаров в углеводных цепях характерно для сердечных гликозидов растений, а в астеросапонидах встречается впервые.

Кроме астеросапонинов, из *H. kurilensis* нами были выделены необычные гликозиды полигидроксистероидов – куриленсозиды А-Ж (**15–24**) и сульфат эхинастерозиды С (**25**) [19–21]. Как правило, гликозиды полигидроксистероидов морских звезд являются монозидами или биозидами. В отличие от них, соединения **15–17** и **23** являются представителями новой структурной группы стероидных тригликозидов морских звезд, содержащих два углеводных фрагмента, один из которых – моносахаридный



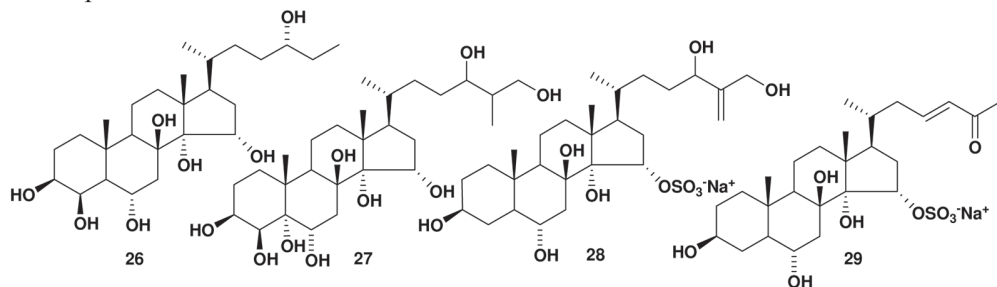
остаток – присоединен к С-3 стероидного ядра, а другой – дисахаридный остаток – локализован у С-24 боковой цепи агликона. Куриленсозиды В-D (16–18) и I (23) имеют редко встречающуюся в гликозидах полигидроксистероидов (1→5) гликозидную связь между моносахаридными остатками.



Как правило, полигидроксистероиды и гликозиды этого типа содержат гидроксильную группу при С-6 стероидного ядра. Однако в куриленсозидах Е (19), F (20)

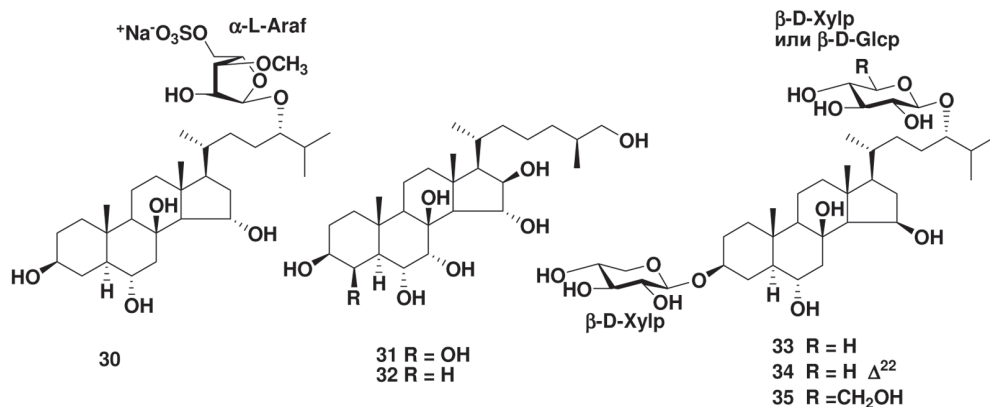
и G (21) она отсутствует. Вероятно, при биосинтезе стероидных метаболитов в этой морской звезде не происходит окисления шестого атома углерода стероидного ядра. В то же время гликозид 22 является единственным стероидом в морских звездах, содержащим 4(5)-эпоксидную группу, хотя 22(23)-эпоксидные группы нередко в них встречаются.

В морской звезде *A. typicus* были обнаружены необычные полигидроксистероиды 26–29 [17]. Все соединения 26–29 содержат гидроксильную группу при C-14, которая встречается еще только в одном виде морских звезд *Dermasterias imbricata*. Стероид 27 содержит редкую 24,26-диольную группировку в боковой цепи. Стероид 29 имеет уникальную Δ^{23E} -27-нор-25-оксохолестановую боковую цепь, которая ранее не была обнаружена в стероидах морского и наземного происхождения. Подобный структурный фрагмент был ранее найден только в составе циклоартановых тритерпеноидов растений.



Учитывая оригинальность структур выделенных полигидроксистероидов 26–29, была предложена схема биосинтеза их боковых цепей (схема 2).

Биологическая активность полярных стероидов. Нейротрофическое и нейропротекторное действие. Было проведено исследование нейритогенных и нейропротекторных свойств полярных стероидных соединений из морских звезд в культуре мышинной нейробластомы C-1300 и в органотипической культуре срезов гиппокампа крыс [26]. Для данного исследования были выбраны основные полярные стероиды наиболее массовых дальневосточных видов морских звезд: астеросапонин P₁, (25*S*)-5 α -холестан-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-октаол и (25*S*)-5 α -холестан-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-гептаол (PP1-PP3, 30–32) из *Patiria pectinifera*, и дистоластерозиды D₁–D₃ (D1-D3, 33–35) из *Distolasterias nipon*.



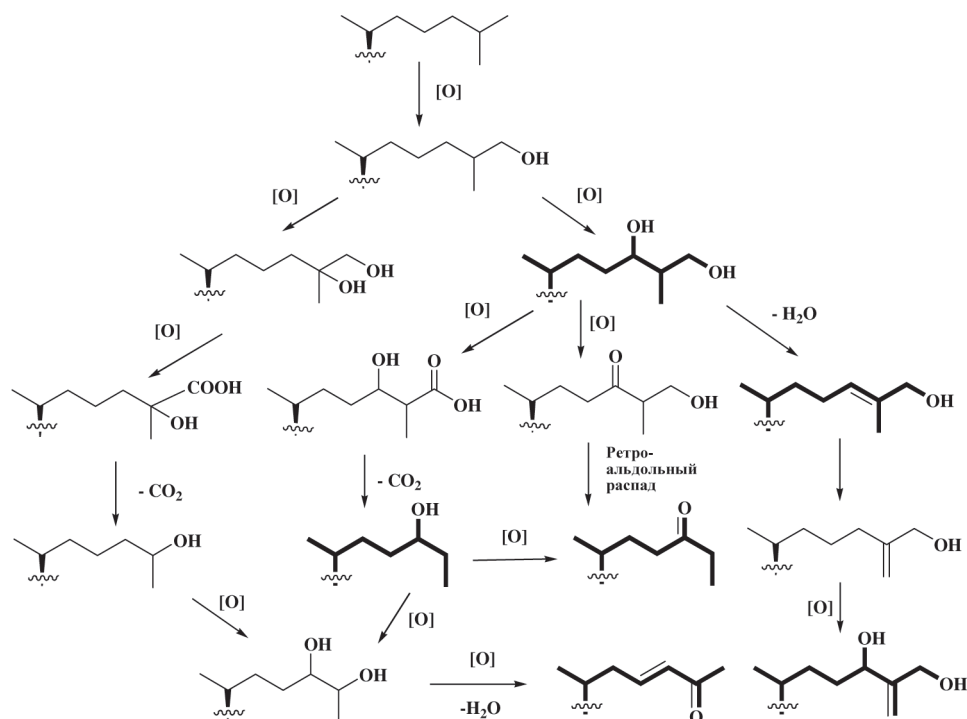


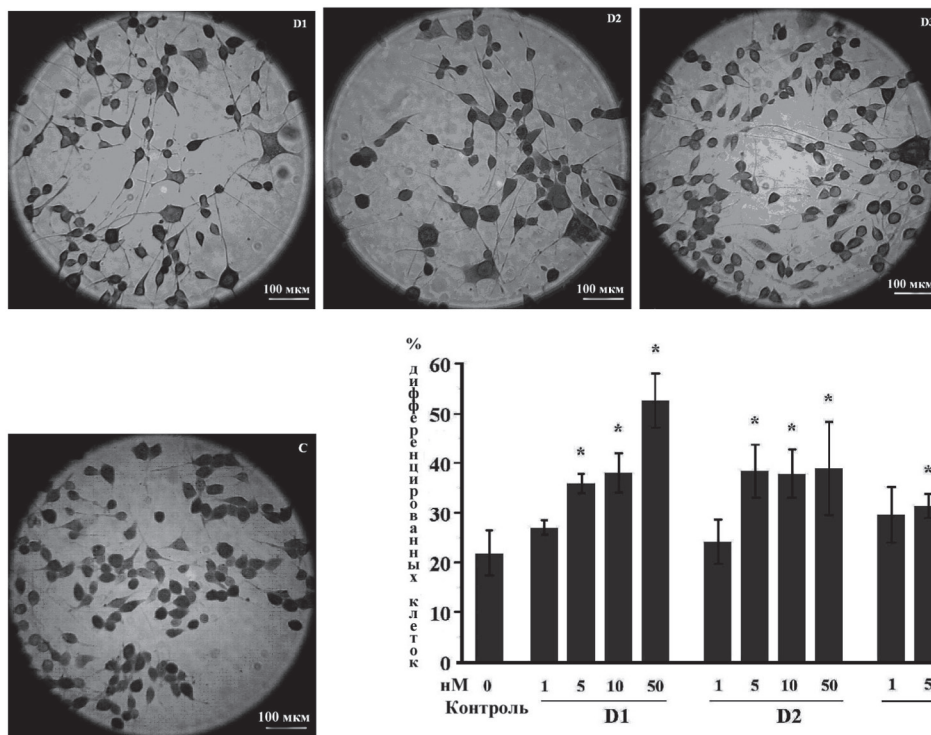
Схема 2. Гипотетическая схема биосинтеза боковых цепей полигидроксистероидов (выделены утолщенными линиями) из *A. typicus*

Все соединения вызывали рост нейритов в клетках нейробластомы. Выраженная зависимость эффекта от концентрации наблюдалась для соединений **30–32** в пределах концентраций 10–100 нМ, а для гликозидов **33–35** – в пределах концентраций 1–50 нМ (рис. 4). Все вещества проявили значительные синергетические нейритогенные эффекты со следовыми количествами фактора роста нервов (NGF, 1 нг/мл) или мозгового нейротрофического фактора (BDNF, 0.1 нг/мл) (рис. 5).

Впервые при использовании культуры мышинной нейробластомы C-1300 и органотипической культуры срезов гиппокампа крыс было показано, что соединения из морских звезд **30–35** обладают нейропротекторными свойствами, поддерживая выживание клеток в условиях отсутствия кислорода и глюкозы (рис. 6).

Цитотоксическая активность и влияние на рост колоний опухолевых клеток. Цитотоксическая активность *in vitro* выделенных соединений была исследована с помощью MTS-метода [11]. Для изучения влияния веществ на формирование и рост колоний опухолевых клеток *in vitro* применяли метод мягких агаров [11]. В качестве моделей для исследования биологической активности выделенных соединений использовали клетки рака кишечника человека HCT-116, рака молочной железы T-47D и меланомы человека RPMI-7951. Влияние астеросапонинов и гликозидов полигидроксистероидов морских звезд на формирование и рост колоний опухолевых клеток было изучено впервые. Ниже приведены наиболее интересные результаты, полученные для двух разных групп полярных стероидов морских звезд: астеросапонинов и стероидных гликозидов полигидроксистероидов.

A



B

Рис. 4. Нейритогенная активность полярных стероидов из *D. nipon* в культуре клеток NB C-1300. (A) Фотографии культуры, обработанной стероидами, и в контроле (C) (обработка соединениями D1, D2 или D3 (33–35) в концентрации 50 нМ в течение 4 дней); (B) Дозозависимые эффекты соединений D1, D2 и D3 (33–35)

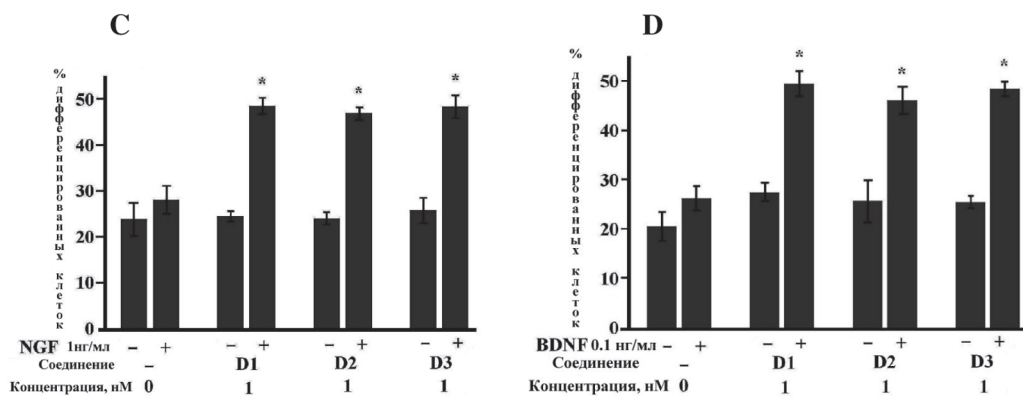


Рис. 5. Синергетические эффекты нейротрофинов и соединений 33–35 на дифференцировку клеток NB C-1300. Эффекты соединений из *D. nipon* и NGF (C) или BDNF (D)

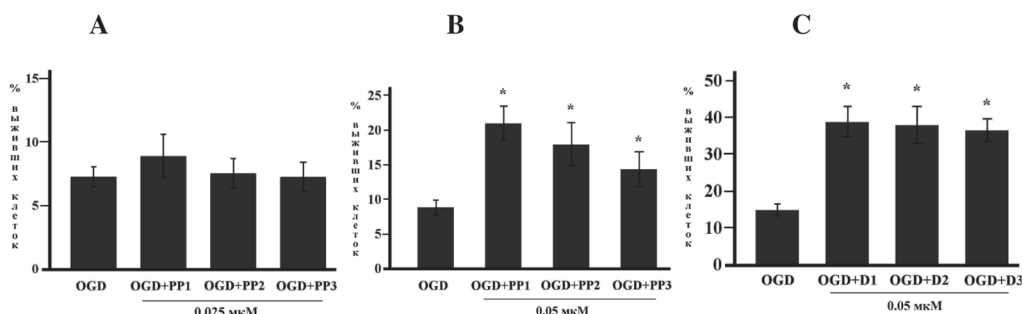


Рис. 6. Защита клеток нейробластомы C-1300 стероидами морских звезд в условиях кислород-глюкозной депривации (OGD). (А) Соединения PP1, PP2 и PP3 (30–32) не способствовали увеличению выживаемости клеток в концентрации 25 нМ; (В) Протекторные эффекты соединений PP1, PP2 и PP3 (30–32) в концентрации 50 нМ; (С) Протекторные эффекты соединений D1, D2 и D3 (33–35) в концентрации 50 нМ

Цитотоксическая активность и влияние на рост колоний опухолевых клеток астеросапонинов регуларозида А (36) и торнастерозида А (37) из *A. carinifera* [11]. Астеросапонин 36 проявил слабую цитотоксическую активность по отношению к клеткам Т-47D, RPMI-7951 и НСТ-116 с IC_{50} 169, 117 и 142 мкМ соответственно. Гликозид 37 по сравнению с соединением 36 показал более сильные цитотоксические свойства с IC_{50} 82, 35 и 70 мкМ соответственно. Оба соединения проявили способность в нетоксичной концентрации (15 мкМ) эффективно подавлять рост колоний опухолевых клеток. Гликозид 36 ингибировал формирование колоний клеток Т-47D на 57% и клеток RPMI-7951 на 26%, а гликозид 37 подавлял формирование колоний клеток Т-47D на 53% и клеток RPMI-7951 на 71%.

Цитотоксическая активность и влияние на рост колоний опухолевых клеток гликозидов полигидроксистероидов из *A. carinifera*: кариниферозидов А, F (38, 39); халитулозидов А, В, D и E (40–43); 6-О-сульфат халитулозида А (44) и его 4''-О-метил аналога (45) [10]. Гликозиды 39, 42–45 не проявили какого-либо значительного цитотоксического эффекта по отношению к клеткам НСТ-116, Т-47D и RPMI-7951 в концентрациях от 10 до 160 мкМ. Гликозид 41 не был токсичен по отношению к клеткам НСТ-116 в тех же концентрациях, но показал незначительную цитотоксическую активность на клетках Т-47D (IC_{50} 154 мкМ) и RPMI-7951 (IC_{50} 128 мкМ). Гликозид 40 проявил слабый цитотоксический эффект только на клетках НСТ-116 (IC_{50} 150 мкМ). Гликозид 38 показал наиболее сильное цитотоксическое действие по отношению ко всем исследуемым типам раковых клеток (IC_{50} в пределах от 32 до 66 мкМ) по сравнению с другими гликозидами.

Было изучено действие гликозидов 38, 39–45 в нетоксичных концентрациях (15 или 20 мкМ) на формирование колоний опухолевых клеток Т-47D и RPMI-7951. Гликозиды 38 и 41 не ингибировали рост колоний клеток Т-47D и подавляли рост колоний клеток RPMI-7951 на 38 и 17% соответственно. Сульфатированные соединения 39, 44 и 45 подавляли рост колоний клеток Т-47D на 38, 64 и 67% соответственно и колоний клеток RPMI-7951 на 57, 60 и 50% соответственно. Гликозиды 40, 42 и 43 ингибировали формирование колоний клеток Т-47D и RPMI-7951 в меньшей степени (от 20

до 30%). Таким образом, наиболее выраженным ингибирующим эффектом обладали сульфатированные гликозиды **39**, **44** и **45**.

Исследование биосинтеза полярных стероидов в морских звездах. Проведено исследование биосинтеза полярных стероидов в дальневосточной морской звезде *Patiria pectinifera* [27]. Впервые экспериментально установлено, что полученные с пищей холестерин и сульфат холестерина являются биосинтетическими предшественниками полигидроксистероидов и родственных им низкомолекулярных стероидных гликозидов морских звезд. В экспериментах по кормлению животных меченные дейтерием предшественники $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ холестерин и сульфат $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ холестерина трансформировались в частично дейтерированные астеросапонин P_1 , (25*S*)-5α-холестан-3β,4β,6α,7α,8,15α,16β,26-октаол и (25*S*)-5α-холестан-3β,6α,7α,8,15α,16β,26-гептаол (**30–32**). Включение атомов дейтерия в молекулы было установлено с помощью ЯМР спектроскопии (рис. 7) и ESI масс-спектрометрии (рис. 8).

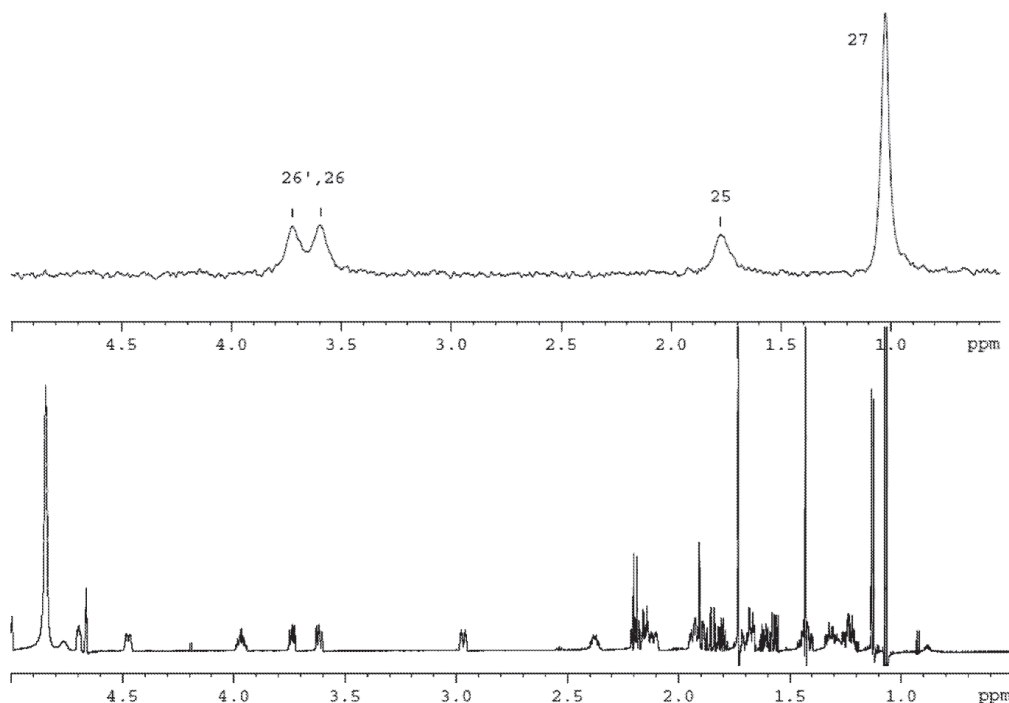


Рис. 7. Фрагменты ^2H ЯМР спектра $[25,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ (25*S*)-5α-холестан-3β,6α,7α,8,15α,16β,26-гептаола (**32а**) (вверху) и ^1H ЯМР спектра контрольного (25*S*)-5α-холестан-3β,6α,7α,8,15α,16β,26-гептаола (**32**) (внизу)

На основе результатов экспериментов с использованием сульфата $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ холестерина как предшественника была предложена схема первых стадий биосинтеза полярных стероидов **30–32**, основанная на включении в их молекулы трех из шести атомов дейтерия и определения их мест локализации.

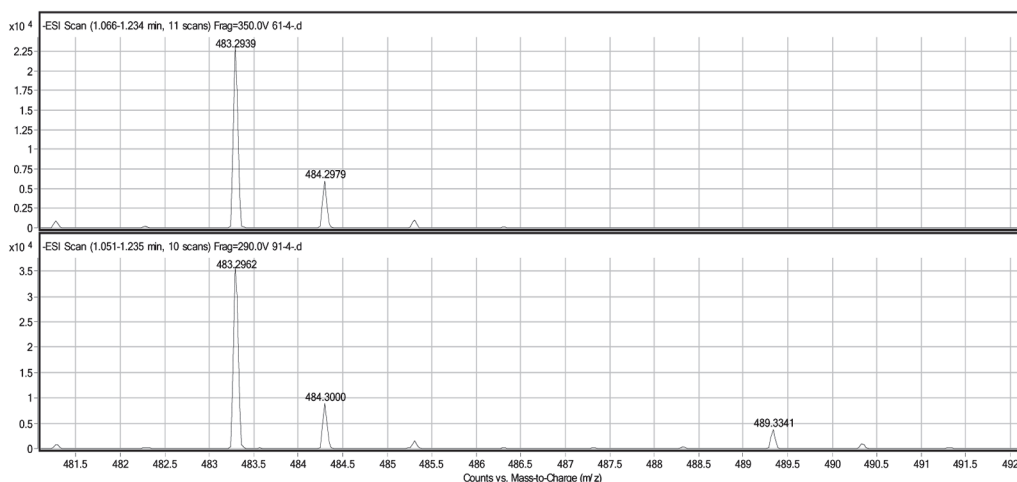


Рис. 8. Фрагменты (–)ESI масс-спектров с пиком депротонированной молекулы $[M - H]^-$ при 483 соединения **32** из контрольной фракции (**вверху**) и дополнительным пиком $[(M - H) + 6]^-$ при m/z 489 соединения **32a**, полученным после кормления $[25,26,26,26,27,27,27\text{-}^2\text{H}_7]$ холестерином (**внизу**)

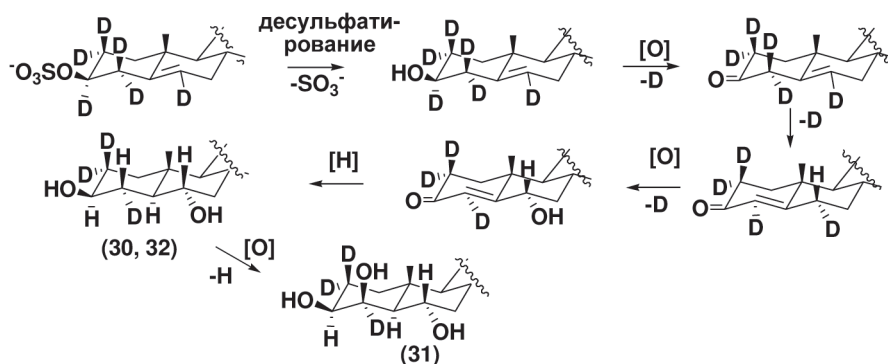


Схема 3. Гипотетические пути биосинтеза $[2,2,4\text{-}^2\text{H}_3]$ меченых полярных стероидов **30–32** из сульфата $[2,2,3,4,4,6\text{-}^2\text{H}_6]$ холестерина

Кроме того, было показано, что в органах пищеварения и гонадах морской звезды меченый холестерин трансформируется в Δ^7 -холестерин (латостерин).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши исследования полярных стероидных соединений из морских звезд за последние 5–6 лет привели к открытию ряда новых стероидов. Были найдены астеросапонины с новыми углеводными цепями, состоящими из 5–6 моносахаридных остатков, включая углеводные цепи, состоящие только из дезоксисахаров,

а также соединения с редкими агликонами, содержащими гидроксильную группу при С-16 стероидного ядра или новые боковые цепи. Впервые выделены триозиды полигидроксистероидов, имеющие два углеводных фрагмента при С-3 стероидного ядра и С-24 боковой цепи агликона соответственно. Найдены новые монозиды полигидроксистероидов с необычными стероидными ядрами (с 4(5)-эпоксигруппой и лишенные гидроксильной группы при С-6), а также свободные полигидроксистероиды с новыми 24-гидрокси-27-нор-, 24,26-дигидрокси- и Δ^{23E} -27-нор-25-оксохолестановыми боковыми цепями.

Изученные полярные стероиды проявляли нейритогенную активность в культуре клеток нейробластомы. Их эффекты были синергичны нейритогенному действию нейротрофинов NGF и BDNF. Изученные вещества действовали как нейропротекторы в отношении культуры клеток нейробластомы и органотипической культуры клеток гиппокама крыс в условиях кислород-глюкозной депривации. Нейротрофиноподобная нейритогенная и нейропротекторная активности являются, вероятно, общими свойствами полигидроксистероидов и родственных гликозидов из морских звезд, хотя степень проявляемых эффектов зависит от особенностей структуры молекул. Некоторые из активных соединений могут быть предложены для дальнейшего изучения в качестве потенциальных субстанций новых нейротрофических и нейропротекторных лекарственных препаратов.

Впервые исследовано влияние астеросапонинов и гликозидов полигидроксистероидов морских звезд на формирование колоний опухолевых клеток. Установлено, что некоторые полярные стероидные соединения в нетоксичных концентрациях эффективно ингибируют рост колоний этих клеток. Показано, что сульфатированные стероидные биозиды обладают более выраженным ингибирующим эффектом по сравнению с близкими по строению несulfатированными соединениями. Можно заключить, что некоторые астеросапонины и сульфатированные бигликозиды полигидроксистероидов перспективны для дальнейшего изучения в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Проведено изучение биосинтеза свободных стероидов и полярных стероидных соединений морских звезд с помощью аквариальных экспериментов с использованием потенциальных биосинтетических предшественников, содержащих стабильные изотопы. Показано, что полигидроксистероиды и родственные им стероидные гликозиды биосинтезируются из полученных этими животными с пищей холестерина и сульфата холестерина. На основании данных о числе и положении атомов дейтерия в продуктах биосинтеза было установлено, что трансформации в стероидных кольцах А и В включают окисление в соответствующие 3-кето-производные и в 4(5)-ненасыщенные 3-кетоны как биосинтетические интермедиаты. Кроме того, было показано, что полученный с пищей холестерин в морских звездах трансформируется в латостерин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант 12-И-П6-11) и гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-546.2012.4

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minale L., Riccio R., Zollo F. // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products/ Eds Herz W., Kirby G.W., Moore R.E., Steglich W., Tamm Ch. Wien; New York: Springer-Verlag, 1993. V. 62. P. 75-308.
2. Стоник В.А. // Успехи химии. 2001. Т. 70, № 8. С. 673-715.
3. Iorizzi M., De Marino S., Zollo F. // Curr. Org. Chem. 2001. V. 5. P. 951-973.
4. Stonik V.A., Ivanchina N.V., Kicha A.A. // Nat. Prod. Comm. 2008. V. 3. P. 1587-1610.
5. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Stonik V.A. // Steroids. 2011. V. 7. P. 425-454.
6. Dong G., Xu T.H., Yang B., Lin X.P., Zhou X.F., Yang X.W., Liu Y.H. // Chem. Biodivers. 2011. V. 8, No. 5. P. 740-791.
7. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Gorshkova I.A., Ponomarenko L.P., Likhatskaya G.N., Stonik V.A. // Comp. Biochem. Physiol. 2001. V. 128B, No. 1. P. 43-52.
8. Fedorov S.N., Shubina L.K., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kwak J.Y., Jin J.O., Bode A.M., Dong Z., Stonik V.A. // Nat. Prod. Commun. 2008. V. 3, No. 10. P. 1575-1580.
9. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. // Chem. Biodivers. 2011. V. 8, No. 1. P. 166-175.
10. Malyarenko T.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. // Steroids. 2011. V. 12, No. 76. P. 1280-1287.
11. Маляренко Т.В., Кича А.А., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Ермакова С.П., Минх Ч.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2012, № 10. С. 1969-1973.
12. Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. // Nat. Prod. Commun. 2012. V. 7, No. 7. P. 853-858.
13. Qi J., Luo Y., Gao L. // Mini Rev. Med. Chem. 2011. V. 1. P. 658-677.
14. Пальянова Н.В., Панкова Т.М., Старостина М.В., Штарк М.Б., Кича А.А., Иванчина Н.В., Стоник В.А. // Бюл. эксперим. биол. мед. 2006. Т. 141, № 5. С. 522-525.
15. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Fedorov S.N., Dyshlovoy S.A., Long P.Q., Stonik V.A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20, No. 12. P. 3826-3830.
16. Кича А.А., Иванчина Н.В., Хьюнг Т.Т.Т., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Лонг Ф.К. // Изв. РАН. Сер. хим. 2010. № 11. С. 2079-2082.
17. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Huong T.T.T., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Agafonova I.G., Long P.Q., Stonik V.A. // Steroids. 2010. V. 75, No. 12. P. 897-904.
18. Маляренко Т.В., Кича А.А., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Смирнов А.В. // Биоорган. химия. 2010. Т. 36, № 6. С. 755-761.
19. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Agafonova I.G., Stonik V.A. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71, No. 5. P. 793-798.
20. Кича А.А., Иванчина Н.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Смирнов А.В. // Биоорган. химия. 2009. Т. 35, № 4. С. 557-562.
21. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. // Steroids. 2009. V. 74, No. 2. P. 238-244.
22. Кича А.А., Иванчина Н.В., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. // Химия природ. соедин. 2012. № 5. С. 719-721.
23. Попов Р.С., Иванчина Н.В., Кича А.А., Маляренко Т.В., Калиновский А.И., Дмитренко П.С. // Химия природ. соедин. 2013. № 2. С. 243-247.
24. Иванчина Н.В., Маляренко Т.В., Кича А.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Ермакова С.П. // Биоорган. химия 2011. Т. 37, № 4. С. 559-566.
25. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Antonov A.S., Radchenko O.S., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Savchenko A.M., Stonik V.A. // Nat. Prod. Commun. 2013. V. 8, No. 9. P. 1219-1222.
26. Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Stonik V.A. // Mar. Drugs. 2013. V. 11, No. 5. P. 1440-1455.
27. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. // Steroids. 2013. V. 78. P. 1183-1191.

ДВУХГОЛОВЫЕ СФИНГОЛИПИДЫ ИЗ МОРСКИХ ГУБОК

Т. Н. Макарьева¹

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

Обсуждены химическое разнообразие, методы установления строения, биосинтез, химический синтез и биологические активности необычных биполярных липидов, т.н. двухголовых сфинголипидов, из тропических морских губок.

Ключевые слова: морские губки, двухголовые сфинголипиды, *Rhizochalina incrustata*, *Oceanapia* sp., *Calyx* sp., *Leucetta microraphis*.

Two-headed sphingolipids from marine sponges. *T. N. Makarieva*¹ (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

Literature data about two-headed sphingolipids from marine sponge (Porifera) are reviewed. Structural diversity, methods of structure elucidation, biosynthesis, chemical synthesis, and biological activities of these natural products are discussed.

Keywords: *marine sponges, two-headed sphingolipids, Rhizochalina incrustata, Oceanapia* sp.; *Calyx* sp.; *Leucetta microraphis*.

В Тихоокеанском институте биоорганической химии практически каждый год проводятся морские экспедиции научно-исследовательского судна «Академик Опарин» в северные и тропические районы Мирового океана. Главной целью этих экспедиций является поиск среди морских беспозвоночных новых источников физиологически активных веществ ранее неизвестных структурных типов. Участникам экспедиций хорошо знаком тот факт, что образцы губок обычно составляют основную часть собираемого биологического материала. Кроме того, биотестирование экстрактов морских беспозвоночных показывает, что экстракты губок намного опережают экстракты из других беспозвоночных как по числу активных образцов, так и по интенсивности разнообразных физиологических эффектов. Это подтверждает, что морские губки являются самым богатым источником биоактивных метаболитов, при том, что они составляют заметную часть бентосных сообществ тропических, умеренных и северных частей Мирового океана, выполняя важную роль в морских экосистемах.

Губки выделяют в отдельный тип Porifera, который в настоящее время насчитывает более 5000 видов. Они значительно различаются между собой не только по форме, но и по вторичным метаболитам, являясь источником самых разнообразных и невероятных по структуре веществ. Возможно, нахождение необычных по биогенезу

¹ Автор для связи (тел.: +7 (423) 231-11-68; эл. почта: makarieva@piboc.dvo.ru).

соединений более всего связано с тем, что губки являются самыми древними многоклеточными организмами нашей планеты. Они были продуктом эволюционного прорыва от одноклеточных к многоклеточным организмам.

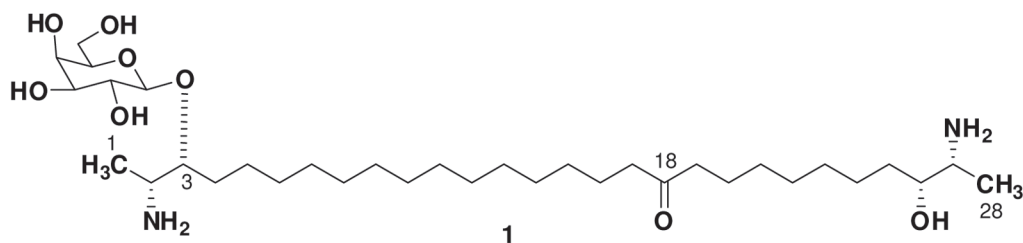
Губки появились на нашей планете, вероятно, более 600 миллионов лет назад и, таким образом, они в 3000 раз старше вида *Homo sapiens*. Возможно, именно на них в процессе эволюции природа «отрабатывала» варианты биосинтеза тех или иных структурных групп биологически активных вторичных метаболитов. Поэтому выделение уникальных метаболитов губок напоминает обнаружение ископаемых форм вымерших организмов, по которым восстанавливают пути их биологической эволюции. В частности, открытие двухголовых сфинголипидов в тропических губках является важным для понимания эволюции биогенеза таких природных соединений как сфинголипиды.

В настоящее время группа биполярных липидов из морских тропических губок насчитывает 14 соединений, 9 из которых были выделены в лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН, где был открыт и первый представитель этой необычной структурной серии. Их объединяет общий «архитектурный» план построения молекул: две полярные головки с амино- и гидроксильными группами в каждой из них разделены 22-24 полиметиленовыми или полиеновыми мостиками. Аминогидроксисодержащие фрагменты данных соединений в большинстве своем напоминают полярные группы сфинголипидов, но в одном из них или даже в двух терминальная гидроксиметиленовая группа замещена на метильный остаток. До сих пор этот класс соединений не имеет одного общего тривиального названия. Их называют биполярными липидами, боламинофилами, бифункционализированными сфинголипидами, бис- α,ω -аминоспиртами, бис-амино-, бис-гидроксипидами, хвост-к-хвосту димерами и вис-1-деоксисфингозинами. Впервые термин двухголовые сфинголипиды к этому типу соединений применил профессор Кингстон, хорошо известный своими работами в области химии природных соединений. Мы будем придерживаться этого термина в качестве тривиального названия для этой группы метаболитов.

1. История открытия

В октябре 1986 г. во время 3-го рейса на НИС «Академик Опарин» на банке Сайя де Майя в Индийском океане водолазным методом была найдена губка, основное тело которой было закопано в песчаном грунте, а на поверхности видны были лишь выросты в виде трубочек. Она была определена как *Rhizochalina incrustata* (в настоящее время этот вид называют *Oceanapia incrustata*) Владимиром Михайловичем Колтуном – известным спонгиологом из Санкт-Петербурга (Зоологический институт РАН). Было найдено, что экстракты губки в низких концентрациях проявляли цитотоксическую и антимикробную активности и показывали в условиях тонкослойного хроматографирования «нестандартное» пятно среднеполярного вещества. Уже во время экспедиции нами было выделено соединение, отвечающее за биологическую активность экстрактов, названного нами ризохалином. В результате дальнейшего изучения данного вещества, выделенного из другого образца губки *R. incrustata*, собранной у берегов Мадагаскара, спектральными методами и с помощью химических превращений удалось определить его химическую структуру без определения относительной и абсолютной конфигурации четырех его асимметрических центров. В 1989 г. была

опубликована статья о выделении и структуре ризохалина (**1**), не имеющего на тот момент никаких близких по химической структуре природных аналогов [1].

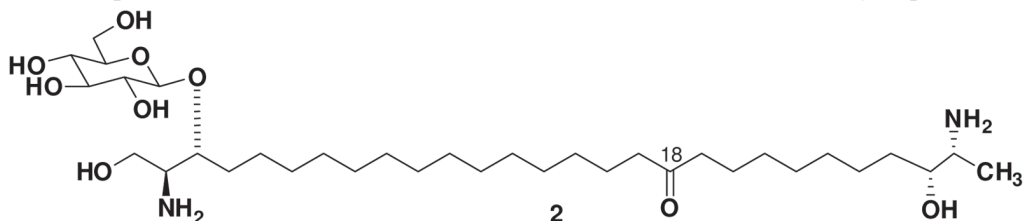


2. Химическое разнообразие

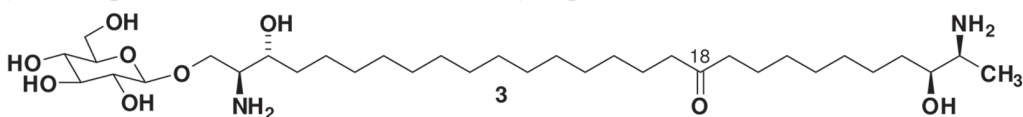
В настоящее время химическое разнообразие двухголовых липидов представлено в основном различными гликозилированными и негликозилированными производными, а также гибридными соединениями, содержащими в качестве второй полярной «головы» производное изохинолина.

2.1. Гликозилированные соединения

В австралийской губке *Oceanapia phillipensis* в лаборатории профессора Молинского (США) через 10 лет после опубликования структуры ризохалина было найдено соединение (**2**), которое они назвали ошенпайзидом [2]. Это соединение показало неплохую активность в отношении флуконазол-устойчивых микроскопических грибов *Candida glabrata*. В отличие от ризохалина, вещество **2** имело на одном конце полярную «голову», идентичную по структуре и конфигурациям асимметрических центров обычным сфинголипидам. Однако углеводная компонента соединения **2** присоединена не к первичной гидроксильной группе, как у всех природных сфингозиновых производных – цереброзидов, а к гидроксильной группе при С-3. Кроме того, в состав ошенпайзида входит не галактозильный остаток, как у ризохалина, а глюкозильный. Углеводородные цепи каждого из этих соединений имели по 28 атомов углерода.

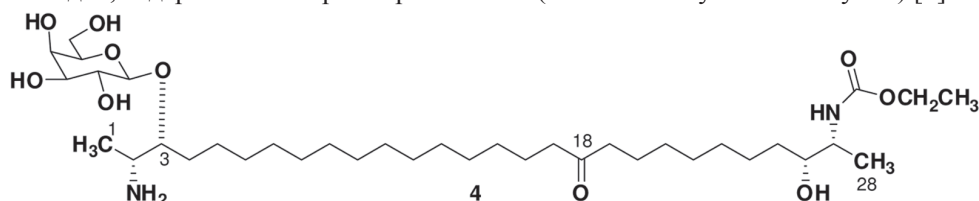


В 2001 г. в лаборатории профессора Кингстона был выделен каликсозид – селективный агент, повреждающий ДНК, из губки рода *Calyx* (семейство Oceanariidae), собранной у берегов Индонезии [3]. Это соединение, в отличие от ошенпайзида, имеет углеводный остаток при С-1, а не при С-3, как в ризохалине и ошенпайзиде. Его углеводородная цепь состоит из 28 атомов углерода, как и в веществах **1** и **2**.

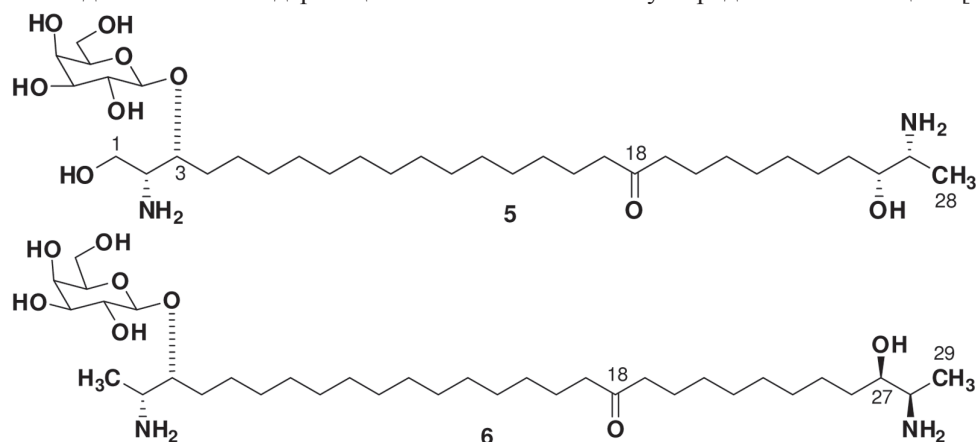


Соединения **1-3** были основными компонентами фракций двухголовых сфинголипидов, их содержание в губках было значительным для вторичных метаболитов и составляло от 0.1 до 0.4% на сухой вес губок. Последующее изучение гликозилированных двухголовых сфинголипидов, выделенных из губок, касаются, в основном, минорных компонентов этой группы соединений.

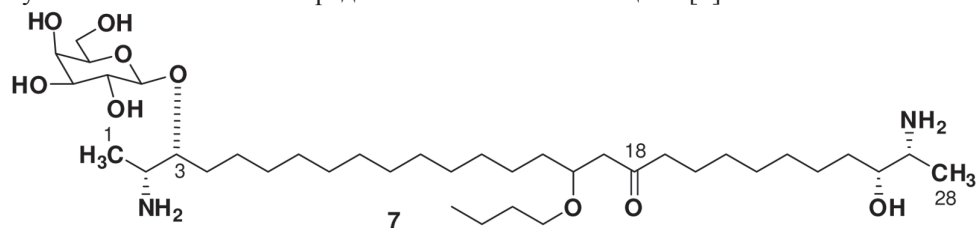
Так, из губки *R. incrustata*, собранной у Сейшельских островов (Индийский океан), наряду с основным компонентом, ризохалином (**1**), был выделен ризохалин А (**4**), имеющий редкую этилкарбоматную группу, ранее не встречавшуюся в классе сфинголипидов, содержание которого крайне мало (0.0006% от сухого веса губки) [4].



Ризохалин С (**5**), минорный компонент из губки *R. incrustata*, собранной у берегов Мадагаскара, имеет левый конец, напоминающий по структуре этот фрагмент ошенпайзида (**2**). Однако у этих соединений не совпадают углеводные компоненты и абсолютная конфигурация при С-2. Ризохалин D (**6**) из этой же губки по химической структуре практически идентичен ризохалину (**1**), но справа от карбонильной группы содержит дополнительную метиленовую группу, что нарушает устоявшееся мнение об этих соединениях как содержащих только по 28 атомов углерода в основной цепи [5].



Из губки *Oceanapia* sp., собранной у северо-западного побережья Австралии, был выделен ризохалин В (**7**), имеющий крайне редкий для природных веществ н-бутанольный остаток в середине полиметиленовой цепи [6].



Вероятно, обнаруженный нами сфинголипид (7) образуется в процессе выделения соответствующего нативного соединения (а, схема 1), имеющего фрагмент α,β -ненасыщенного кетона, при присоединении к нему бутанола [6].

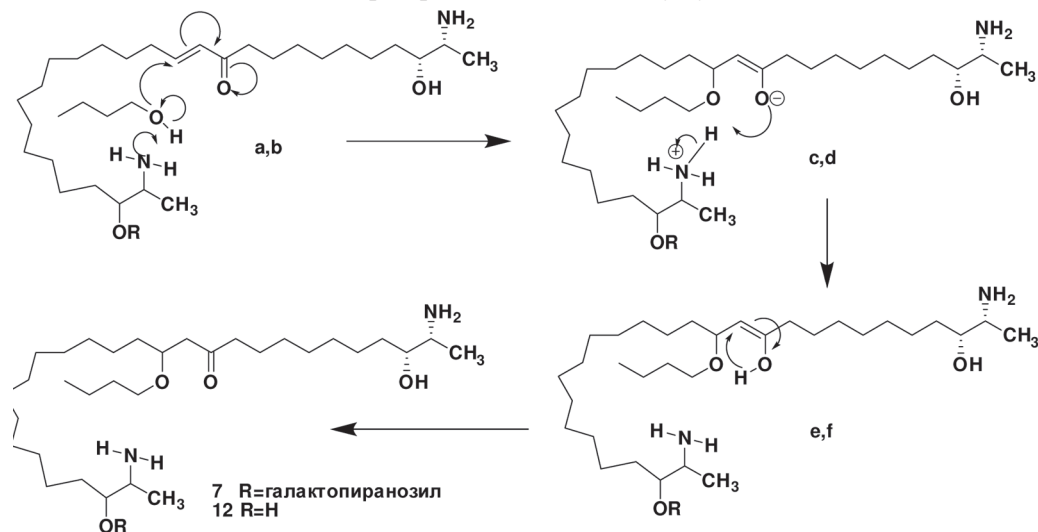
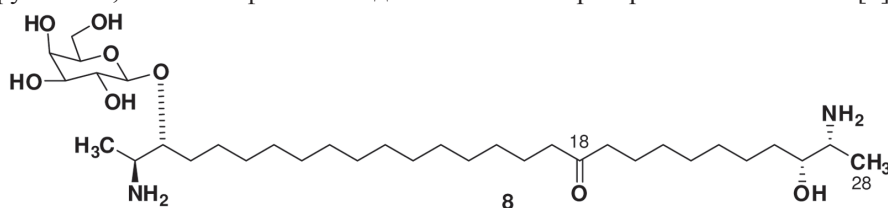


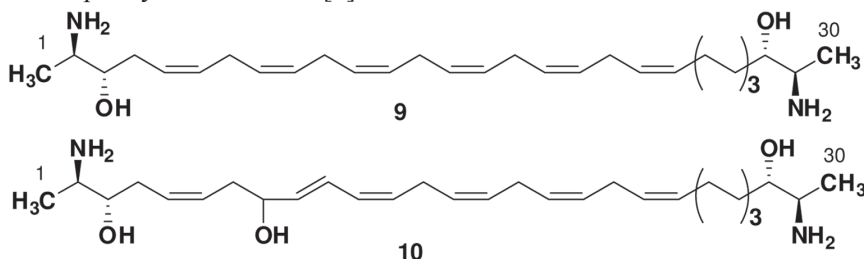
Схема 1. Предполагаемый механизм образования соединений 7 и 12

Из губки *R. incrustata*, собранной у берегов Мадагаскара, был выделен изоризохалин (8), содержание которого примерно в 50 раз меньше, чем ризохалина (1) [7]. После определения абсолютной конфигурации его четырех асимметрических центров обнаружилось, что этот сфинголипид является эписомом ризохалина по C-2 [7].

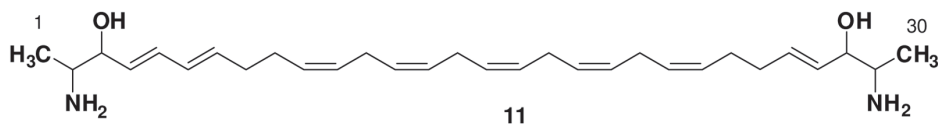


2.2. Негликозилированные производные

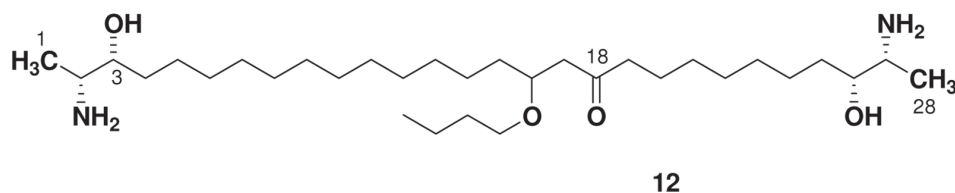
В 1993 г. в лаборатории профессора Фолкнера из известковой морской губки *Leucetta microraphis* были выделены первые негликозилированные природные соединения, родственные по структуре ризохалину – леуцетамолы А и В (9, 10), проявляющие антимикробную активность [8].



Из неидентифицированной известковой губки, собранной у берегов Австралии в 1997 г., было выделено вещество, названное BRS1 (**11**), близкое по структуре к леуцетамолам А и В и обладающее противоопухолевой активностью [9]. Соединение **11**, также как и леуцетамолы, содержит 30 атомов углерода, и, в отличие от ризохалина, не имеет в своих структурах углеводных остатков. Как и многие найденные ранее природные противоопухолевые соединения, BRS1 является ингибитором протеин киназы С.

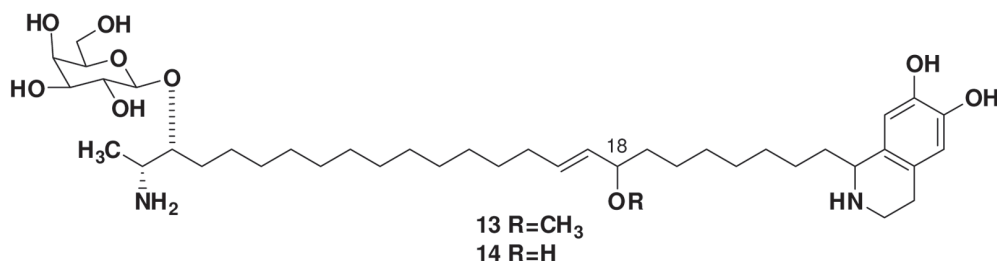


Кроме C_{30} негликозилированных двухголовых сфинголипидов нами был выделен агликон ризохалина В, который мы назвали ризохалинином В (**12**). Его гипотетический биогенез представлен на схеме 1 [6].



2.3. Алкалоидолипиды

Одной из удивительных находок в этом классе соединений, на наш взгляд, является выделение оценолинов А и В (**13,14**) – гибридов сфинголипида и производного изохинолина [10]. Оценолин В был наряду с ризохалином одним из основных компонентов губки *Oceanapia* sp., собранной у северо-западного побережья Австралии. Так же, как в ризохалине (**1**), ошенпайзиде (**2**) и каликсозиде (**3**), липидный мостик между двумя «головами» в оценолинах А и В состоит из 22 атомов углерода.



3. Разработка методов установления строения

В процессе исследования строения двухголовых сфинголипидов – принципиально нового класса природных соединений, исследователи столкнулись с тем, что существующие методы не дают возможности установления точного положения карбонильной группы или выявления абсолютной конфигурации всех четырех асимметрических центров. Поэтому для этого класса веществ были разработаны структурные методы, которые могут быть применены и к другим похожим по структуре соединениям.

3.1. Установление положения карбонильной группы

Карбонильная группа в ризохалинах (**1**, **4-6**, **8**), ошенпайзиде (**2**) и каликсозиде (**3**) отделена от полярных групп слева 14, справа – 7 метиленовыми группами. Поэтому все методы ЯМР спектроскопии, включая НМВС эксперименты, не помогают «дотянуться» до этой группы из-за перекрывающихся друг с другом сигналов полиметиленовых мостиков. Масс-спектрометрические методы также не дают достаточно надежной информации о локализации этой группы, так как фрагментарные ионы в масс-спектрах, связанные с «расщеплением» углерод-углеродных связей рядом с карбонилем, намного меньше по интенсивности, чем ионы, связанные с элиминированием функциональных групп в полярных «головках» этих соединений. Имея ризохалин (**1**) в достаточном количестве, мы разработали способ деградации ризохалина, используя реакцию Байера-Виллигера (схема 2).

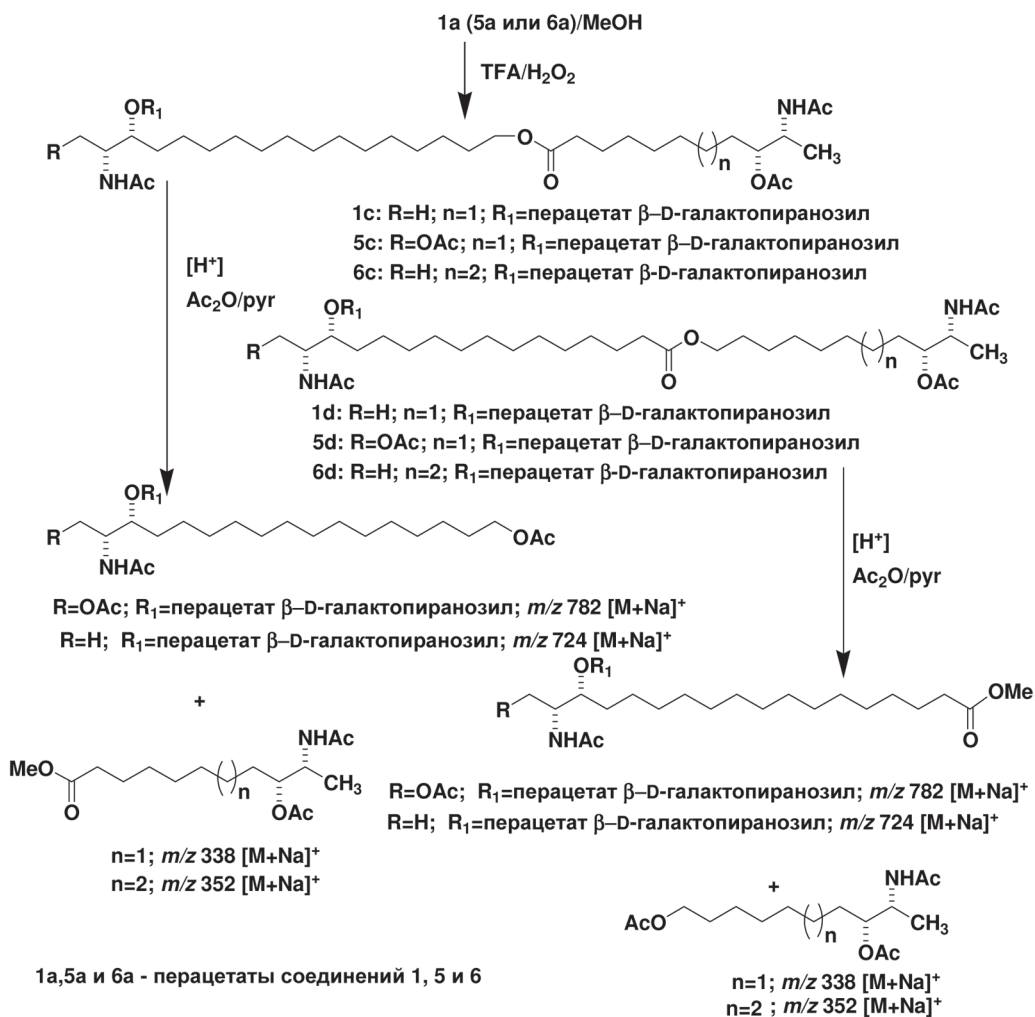


Схема 2. Деградация ризохалина и ризохалинов С и D по реакции Байера-Виллигера

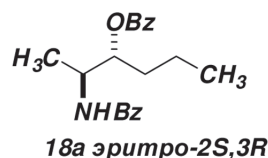
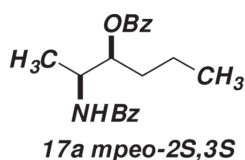
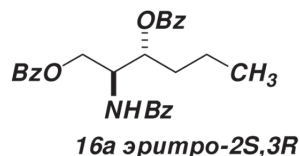
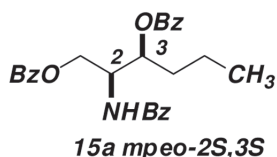
Установление структур продуктов этой реакции совершенно точно определило положение карбонила при C-18 в полиметиленовой цепи ризохалина (**1**) [1]. Так как ошенпайзид (**2**) был выделен в небольшом количестве, метод установления положения карбонильной группы, предложенный нами, не был использован. Вместо него группой Молинского был применен масс-спектрометрический анализ дейтерированного производного, полученного при длительном стоянии вещества в дейтерорастворителе. В результате было найдено, что карбонильная группа в ошенпайзиде расположена при C-11, а не при C-18, как в ризохалине [2]. Однако, как показали наши последующие совместные с этой группой ученых исследования, это определение было ошибочным, и в ошенпайзиде (**2**), как и в ризохалине (**1**), карбонильные группы находятся при C-18 [5].

При определении структуры каликсозида (**3**) использовали ряд химических превращений, включая реакцию гидроаминирования карбонильной группы, с последующим масс-спектрометрическим анализом полученного аминопроизводного перацетилированного агликона каликсозида [5]. Был найдено, что карбонильная группа в соединении **3**, как и в соединениях **1**, **2**, находится при C-18 (в статье [5] приведены неправильные структуры **1** и **2**). Следует отметить, что наш метод и способ Кингстона могут быть использованы для веществ, выделенных в достаточных количествах (более 1 мг), и совершенно не подходят, когда исследователи имеют дело с минорными компонентами. Мы разработали более удобный метод для изучения этого типа веществ, состоящий из трех последовательных превращений в одном сосуде, с последующим масс-спектрометрическим анализом полученных продуктов. В этом случае можно получить надежные результаты на количествах от 0.1 мг исходного вещества (схема 2) [5].

3.2. Определение абсолютной стереохимии асимметрических центров

Профессором Молинским был разработан изящный метод определения абсолютной конфигурации всех четырех асимметрических центров двухголовых сфинголипидов [11]. Для этих целей из *L*-серина и *L*-аланина были синтезированы модельные соединения (**15-18**), имитирующие левые и правые «головы» двухголовых сфинголипидов. Эти вещества были превращены в пербензоатные производные (**15a-18a**). Были выявлены закономерности в их ¹H ЯМР спектрах, позволяющие надежно отличать *эритро*- от *трео*- конфигурации для каждой головы липидов. Было найдено, что спектры кругового дихроизма (КД) модельных веществ (**15a-18a**) зависят от *эритро*-/*трео*-стереохимии и абсолютной конфигурации при C-2 и C-3. Затем были рассчитаны все возможные гибридные КД спектры из линейных комбинаций модельных пербензоатов, вид которых зависит от того, какие два модельных вещества были выбраны, а не от того, связаны они полиметиленовым мостиком или находятся в виде отдельных молекул [11]. Например, для ризохалина было вычислено 8 неодинаковых гибридных КД спектров, соответствующих 8 разным по стереохимии виртуальным молекулам двухголовых сфинголипидов [12]. Далее из природного соединения получали пербензоат агликона и определяли его КД спектр. Сравнение КД спектров пербензоата агликона природного двухголового сфинголипида с гибридными КД спектрами виртуальных молекул привело к недвусмысленному определению конфигурации всех четырех асимметрических центров в ризохалине [12].

Этот метод позволяет вычислить стереохимию на самом минимальном количестве природного соединения. С использованием этого метода были определены абсолютные конфигурации у ошенпайзида (**2**) [11], ризохалина (**1**) [12], каликсозида (**3**) [3], ризохалинов С и D (**5**, **6**) [5], изоризохалина (**8**) [7] и леуцетамола А (**9**) [13], которые приведены в таблице. Для остальных соединений абсолютные или относительные конфигурации были найдены путем сравнения спектральных данных с данными веществ известной стереохимии.



Абсолютные конфигурации для α- и ω-концов двухголовых сфинголипидов

Соединение	α-конец		ω-конец	
	<i>трео</i>		<i>трео</i>	
Ризохалин (1)	2R	3R	26R	27R
	<i>эритро</i>		<i>трео</i>	
Ошенпайзид (2)	2S	3R	26R	27R
	<i>эритро</i>		<i>трео</i>	
Каликсозид (3)	2S	3R	26S	27S
	<i>трео</i>		<i>трео</i>	
Ризохалин С (5)	2R	3R	26R	27R
	<i>трео</i>		<i>трео</i>	
Ризохалин D (6)	2R	3R	27R	28R
	<i>эритро</i>		<i>трео</i>	
Изоризохалин (8)	2S	3R	26R	27R
	<i>эритро</i>		<i>эритро</i>	
Леуцетамол (9)	2R	3S	28S	29R

4. Биосинтез

В настоящее время ничего не известно о биосинтезе двухголовых сфинголипидов. Однако анализ и сравнение структур этих соединений позволяют сделать некоторые предположения об их биосинтетических путях.

Во-первых, в биогенезе одной (соединения **2**, **3**, **13**, **14**) или даже двух «голов» (соединения **1**, **4-12**), по-видимому, участвует аланин, а не серин, что отличает их биосинтез от биосинтеза обычных сфинголипидов. Еще большее удивление вызыва-

ет их биогенез, если учитывать абсолютные конфигурации аминокислот, из которых построены липиды **1-14** (таблица). Например, в этих липидах имеются фрагменты одной (соединения **2, 5, 8**) и даже двух (соединения **1, 6, 9**) молекул *D*-аланина вместо включения в биосинтез аминокислот *L*-ряда, как для подавляющего большинства природных веществ. Эти вещества могут быть построены не только из *D*-аланина, но и из *D*-серина (ризохалин С). Более того, эти вещества преподносят еще один сюрприз – в одной и той же молекуле могут быть одновременно фрагменты *D*- и *L*-аминокислот (вещества **2** и **8**). Для изоризохалина (**8**), в биогенезе которого вероятно участвуют *D*- и *L*-аланин, мы предложили схему биогенеза, в которую включили возможность инверсии абсолютной конфигурации молекул при участии ферментов инвертаз [7].

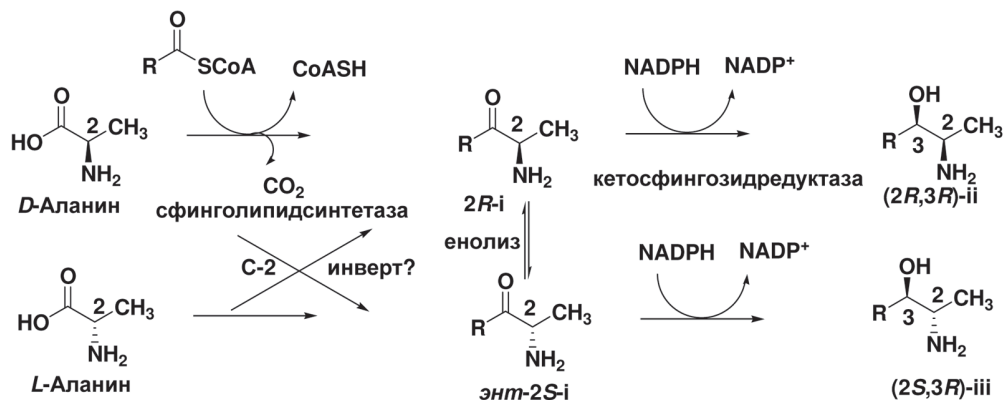


Схема 3. Предполагаемый биосинтез изоризохалина (**8**)

Во-вторых, «архитектура» этого класса соединений уникальна. В настоящее время неизвестны липидные предшественники, на основе которых идет «построение» двух полярных «голов». Обращает на себя внимание одно и то же положение карбонильной группы в полиметиленовой цепи, очевидно указывающее на то, что эта точка (C-18) является узлом стыковки двух частей двухголовых сфинголипидов.

В-третьих, анализ структур оценалинов А и В (**13, 14**) предполагает возможность совместного протекания сфинголипидного и изохинолинового биосинтетических путей для природных соединений.

Все эти пути построения сфинголипидов, по-видимому, являются «ископаемыми», т.е. отвергнутыми в процессе биохимической эволюции, в ходе которой для других сфинголипидов эукариот была выбрана лишь одна полярная «голова» и универсальная аминокислотная компонента – *L*-серин.

5. Синтез

Прошло почти четверть века с момента опубликования структуры ризохалина – первого представителя двухголовых сфинголипидов, и лишь в 2013 г. профессор Молинский сообщил о полном синтезе агликона одного из них – ризохалинина С [14]. В качестве исходного вещества был выбран коммерчески доступный и дешевый *D*-глюкозамин. Используя реакцию Барбье, при катализе порошком индия, в пять

NC[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)O
 $\longrightarrow$
N[C@H](O)C[C@H](O)O
 $\longrightarrow$
N[C@H](O)C[C@H](O)O

D-глюкозамин
 D-сериновые синтоны

N[C@H](O)C[C@H](O)O
 $\longrightarrow$
N[C@H](O)C[C@H](O)O
 $\longrightarrow$
N[C@H](O)C[C@H](O)O

12
 2
3

6. Биологическая активность

40

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время известно 14 двухголовых сфинголипидов, представителей нового класса природных соединений. Уникальность их химических структур, включая абсолютные конфигурации, дала возможность значительно расширить наши знания о существовании ранних путей биосинтеза сфинголипидов. Новизна архитектурного построения молекул двухголовых сфинголипидов стала стимулом для развития новых методов и подходов при установлении химических структур природных соединений, включая определение абсолютной стереохимии. Изучение биологической активности показало их перспективность в качестве модуляторов сфинголипидного метаболизма, эффекторов TRP каналов, а также антигрибковых, антиопухолевых и антиканцерогенных веществ. После недавно осуществленного первого полного синтеза ризохалинина С можно ожидать получения ряда аналогичных веществ с последующим изучением их биологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-546. 2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makarieva T.N., Denisenko V.A., Stonik V.A., Milgrom Yu.N., Rashkes Ya.W. // *Tetrahedron Lett.* 1989. V. 30. P. 6581-6584.
2. Nicholas G.M., Hong T.W., Molinski T.F., Lerch M.L., Cancilla M.T., Lebrilla C.B. // *J. Nat. Prod.* 1999. V. 62, No. 12. P. 1678-1681.
3. Zhou B.N., Mattern M.P., Johnson R.K., Kingston D.G.I. // *Tetrahedron.* 2001. V. 57, No. 47. P. 9549-9554.
4. Makarieva T.N., Guzii A.G., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Santalova E.A., Pokanevich E.V., Molinski T.F., Stonik V.A. // *J. Nat. Prod.* 2005. V. 68, No. 2. P. 255-257.
5. Makarieva T.N., Dmitrenok P.S., Zakharenko A.M., Denisenko V.A., Guzii A.G., Li R.H., Skipper C.K., Molinski T.F., Stonik V.A. // *J. Nat. Prod.* 2007. V. 70, No. 12. P. 1991-1998.
6. Makarieva T.N., Guzii A.G., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. // *Russ. Chem. Bull.* 2008. V. 57. P. 669-673.
7. Makarieva T.N., Dmitrenok P.S., Zakharenko A.M., Denisenko V.A., Guzii A.G., Savina A.S., Dalisay D.S., Molinski T.F., Stonik V.A. // *Lipids.* 2009. V. 44, No. 12. P. 1155-1162.
8. Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Guzii A.G., Santalova E.A., Stonik V.A., MacMillan J.B., Molinski T.F. // *Org. Lett.* 2005. V. 7, No. 14. P. 2897-2900.
9. Kong F.H., Faulkner D.J. // *J. Org. Chem.* 1993. V. 58, No. 4. P. 970-971.
10. Willis R.H., De Vries D.J. // *Toxicon.* 1997. V. 35, No. 7. P. 1125-1129.
11. Nicholas G.M., Molinski T.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122, No. 17. P. 4011-4019.
12. Molinski T.F., Makarieva T.N., Stonik V.A. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000. V. 39, No. 22. P. 4242-4245.
13. Dalisay D.S., Tsukamoto S., Molinski T.F. // *J. Nat. Prod.* 2009. V. 72, No. 3. P. 353-359.
14. Ko J., Molinski T.F. // *J. Org. Chem.* 2013. V. 72, No. 3. P. 498-505.

15. *Fedorov S.N., Makarieva T.N., Guzii A.G., Shubina L.K., Kwak J.Y., Stonik V.A.* // *Lipids*. 2009. V. 44. P. 777-785.
16. *Jin J.O., Shastina V.V., Park J.I., Han J.Y., Makarieva T.N., Fedorov S.N., Rasskazov V.A., Stonik V.A., Kwak J.Y.* // *Biol. Pharm. Bull.* 2009. V. 32. P. 955-962.
17. *Khanal P., Kang B.S., Yun H.J., Cho H.G., Makarieva T.N., Choi H.S.* // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34, No. 10. P. 1553-1558.
18. *Sibirtsev J.T., Shastina V.V., Menzorova N.I., Makarieva T.N., Rasskazov V.A.* // *Mar. Biotechn.* 2010. V. 12, No. 7. P. 536-543.
19. *Gorshkova I.A., Makarieva T.N., Stonik V.A., Berdyshev E.V.* // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 739-739.
20. *Tsukamoto S., Takeuchi T., Rotinsulu H., Mangindaan R.E.P., Van Soest R.W.M., Ukai K., Kobayashi H., Namikoshi M., Ohta T., Yokosawa H.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. P. 6319-6320.
21. *Chianese G., Fattorusso E., Putra M.Y., Calcinai B., Bavestrello G., Moriello A.S., De Petrocellis L., Di Marzo V., Taglialatela-Scafati O.* // *Mar. Drugs*. 2012. V. 10, No. 11. P. 2435-2447.

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ГОЛОТУРИЙ: ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОСИНТЕЗА

А. С. Сильченко, С. А. Авилов, В. И. Калинин¹, В. А. Стоник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 159.

Двадцать восемь новых минорных тритерпеновых гликозидов выделено из дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Ряд гликозидов имеет уникальные структурные черты, включая: присутствие гидроксильной группы при C-18 агликона, не имеющего лактонного цикла, что может рассматриваться как признак промежуточного «горячего» метаболита в биосинтезе тритерпеновых гликозидов; 27-нор-голостановый агликон, что является весьма редким для природных соединений; 23E,25-диеновую систему в боковой цепи агликона; уникальную 16(22)-эпоксигруппу в агликоне и необычную трисахаридную углеводную цепь. Обнаружение кукумариозида A₈, имеющего C-18 и C-20 гидроксильные группы в агликоне вместо 18(20)-лактона, позволяет выяснить некоторые особенности биосинтеза гликозидов. Предложена гипотетическая схема биосинтеза с образованием ланостановых производных с 7(8)-двойной связью из простеринового катиона. Обнаружение кукумариозидов B₁ и B₂, имеющих трисахаридную «неразвитую» углеводную цепь и «развитые» голостановые агликоны, подтверждает мозаичный тип биосинтеза гликозидов. Удлинение углеводной цепи может проходить путем последовательного присоединения моносахаридных остатков в различные положения формирующейся цепи с ее дальнейшим сульфатированием. Цитотоксическая и гемолитическая активности полученных гликозидов, изученные в экспериментах на различных типах клеток, зависят от химической структуры и хорошо коррелируют друг с другом из-за сходного стерин-зависимого механизма.

Ключевые слова: тритерпеновые гликозиды, голотурии, *Eupentacta fraudatrix*, цитотоксическая активность, биосинтез.

Triterpene glycosides from sea cucumbers: chemical structure, biological activities and some trends of biosynthesis. A. S. Silchenko, S. A. Avilov, V. I. Kalinin¹, V. A. Stonik (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

Twenty eight new minor triterpene glycosides have been isolated from the Far Eastern sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Some glycosides have uncommon structural features including: unique hydroxy group at C-18 of the aglycone having no lactone ring that may be considered as intermediate “hot” metabolite in biosynthetic transformations of triterpene glycosides; 27-nor-holostane aglycone that is very rare among natural products; 23E,25-diene system in aglycone side chain; unprecedented 16(22)-epoxy-group in the aglycone and unique trisaccharide carbohydrate chain. The finding of novel glycoside cucumarioside A₈ from *E. fraudatrix* having C-18 and C-20 hydroxyl groups in the aglycone instead of 18(20)-lactone allows to clarify some peculiarities of triterpene glycoside biosynthetic pathways. The hypothetical scheme of biosynthesis with direct formation of lanostane derivatives with a 7(8)-double bond from protosteroid cation is proposed. The

¹ Автор для связи (+7 (423) 231-11-68; эл. почта: kalininv@piboc.dvo.ru).

structures of cucumariosides B₁ and B₂ having trisaccharide “non-developed” carbohydrate chains and holostane type “developed” aglycones confirm mosaic type of biosynthesis. The prolongation of sugar chain passes through the consequent attachment of monosaccharide units to different positions of forming oligosaccharide chains and following sulfation. Cytotoxic activity against different cells and hemolytic activity of glycosides approximately correlate to each other because of common sterol-dependent mechanism and depend on the chemical structure of the glycosides.

Keywords: triterpene glycosides, sea cucumbers, *Eupentacta fraudatrix*, cytotoxic activity, biosynthesis.

Изучение тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова – традиционное направление работ, которые выполняются уже более 40 лет. Внимание к таким гликозидам привлечено их высокой и разнообразной биологической активностью, большим структурным разнообразием и огромной популярностью их продуцентов – съедобных голотурий (трепангов) – в качестве полезных разновидностей морской пищи. Трепанги высоко ценятся на рынках азиатских, а в последнее время и не только азиатских, стран, где используются как в качестве пищевых продуктов, так и в традиционной медицине. В настоящей статье, в основном, сообщается о новых тритерпеновых гликозидах из дальневосточной голотурии *Eupentacta* (= *Cucumaria*) *fraudatrix*, собранной на Морской экспериментальной станции нашего института.

Голотурии или морские огурцы являются морскими беспозвоночными, принадлежащими к классу Holothurioidea типа Echinodermata. В качестве характерных вторичных метаболитов они содержат тритерпеновые гликозиды. Молекулы тритерпеновых гликозидов состоят из агликонной части и углеводной цепи. Большинство гликозидов имеет в качестве агликонов голостановые производные. «Голостан» – это модельное, ни разу не выделенное из других природных источников тритерпеновое ланостановое соединение, содержащее 18(20)-лактон и лежащее в основе скелетной системы агликонной части и номенклатуры большинства тритерпеновых гликозидов (рис. 1) [1].

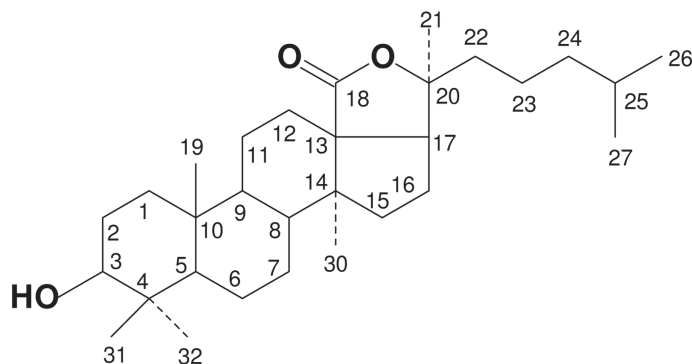


Рис. 1. Структура голостана – модельного соединения ланостанового ряда с 18(20)-лактоном [1]

Гликозиды голостанового ряда содержат агликоны, отличающиеся друг от друга по положению двойной связи в тетрациклическом ядре, по наличию или отсутствию кислородных заместителей в ядре и по структуре боковой цепи (рис. 2).

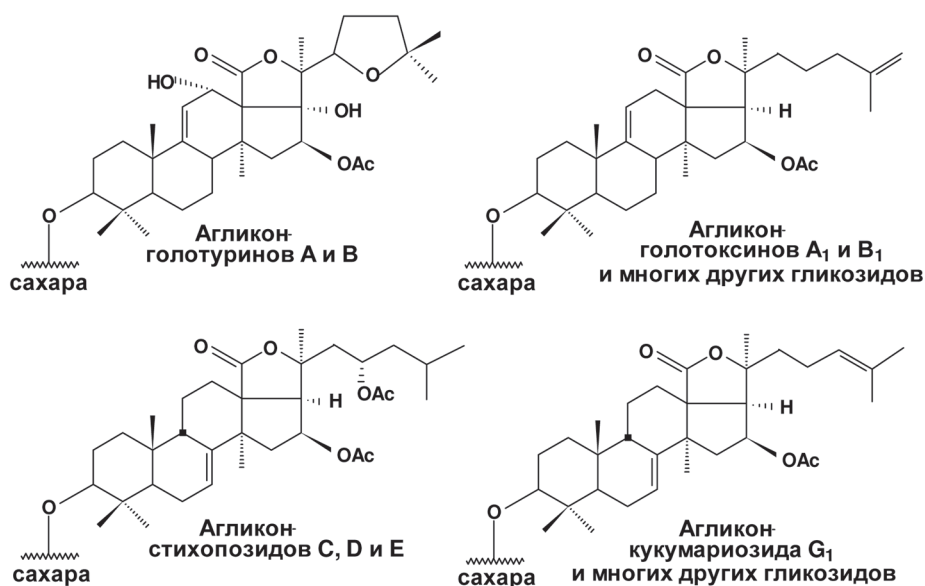


Рис. 2. Примеры голостановых агликонов гликозидов голотурий: агликон голотуринов А и В [2, 3]; агликон голотоксинов А₁ и В₁ и многих других гликозидов [4–6]; агликон стихопозидов С, D и E [7–9]; агликон кукумариозида G₁ [10] и многих других гликозидов [5, 6]

Некоторые из гликозидов (т.н. неголостановые гликозиды) имеют агликоны с 18(16)-лактоном или не содержат лактонного цикла, а также имеют укороченные боковые цепи (*нор*-ланостановые производные). Последние несколько структурных типов гликозидов были открыты в нашем институте (рис. 3).

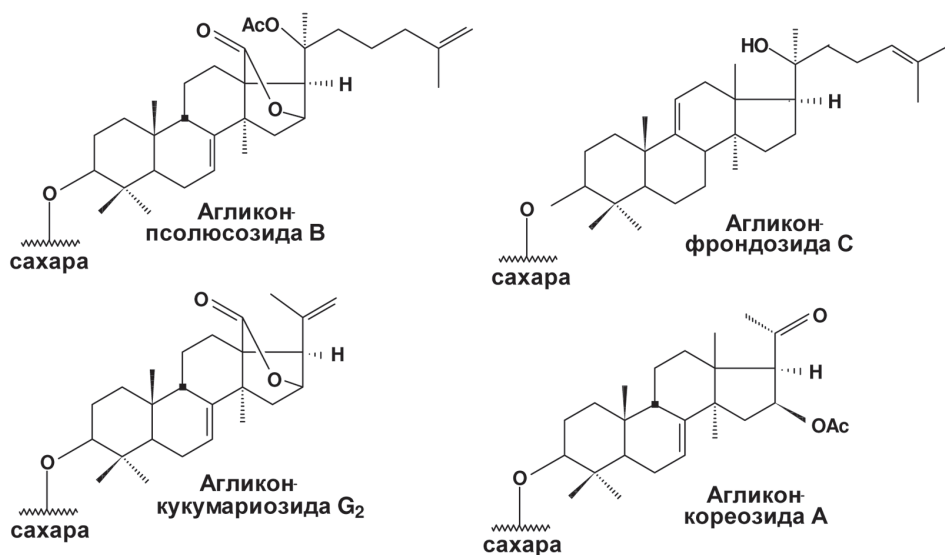


Рис. 3. Примеры неголостановых агликонов гликозидов голотурий: агликон псолюзозида В [11]; агликон фрондозиди С [12]; агликон кукумариозида G₂ [13], агликон кореозиди А [14]

Углеводные цепи гликозидов, как правило, включают в себя от двух до шести моносахаридных остатков и могут также иметь от одной до трех сульфатных групп. Первый моносахаридный остаток – это всегда ксилоза, присоединенная в третье положение аглика. Углеводные цепи могут быть линейными (включать в себя два, три или, обычно, четыре моносахаридных остатка) или разветвленными (рис. 4).

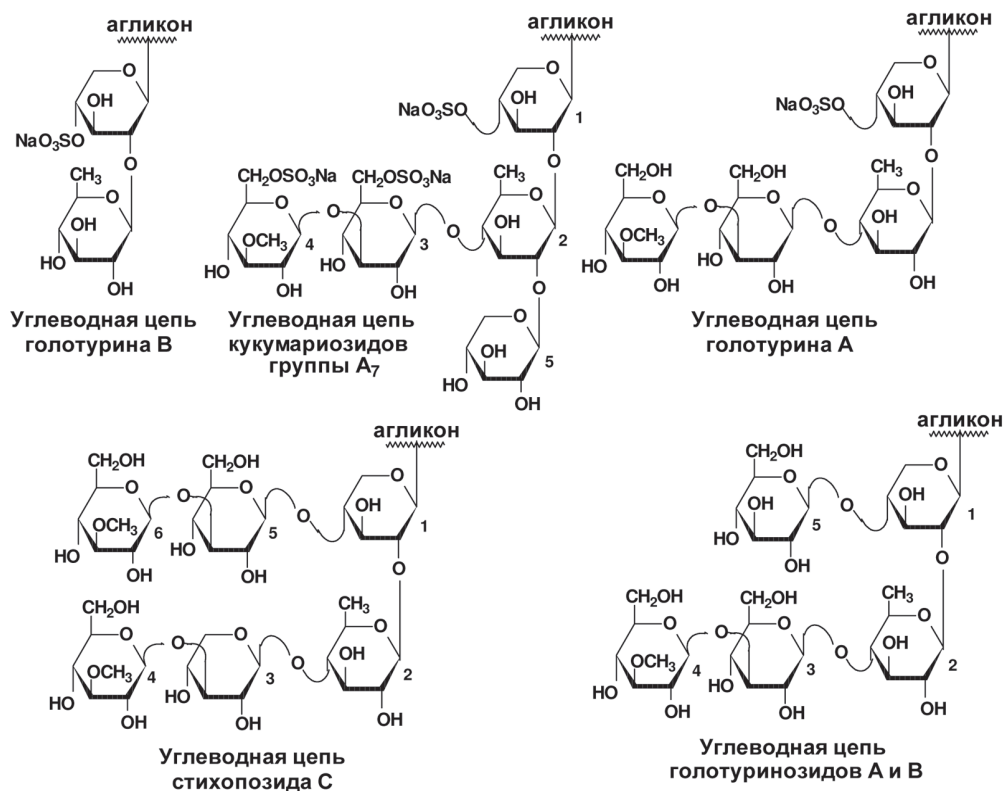


Рис. 4. Некоторые углеводные цепи гликозидов из голотурий: углеводная цепь голотурина В [3]; углеводная цепь кукумариозидов группы А₇ [15]; углеводная цепь голотурина А [2]; углеводная цепь стихопозид С [7]; углеводная цепь голотуринозидов А и В [16]

Класс *Holothurioida* включает 7 отрядов, однако большинство гликозидов выделено из голотурий, принадлежащих к отрядам *Aspidochirotida* и *Dendrochirotida*. Представители отряда *Aspidochirotida* легко доступны на мелководьях тропических морей и обычно содержат значительные количества тритерпеновых гликозидов, что облегчает выделение индивидуальных соединений. По мере накопления данных о структурах гликозидов и их таксономическом распределении стала совершенно очевидна их таксономическая специфичность. Для тритерпеновых гликозидов голотурий характерна вариабельность по некоторым структурным деталям в сочетании со стабильностью общего плана строения, что делает удобным их использование в качестве таксономических маркеров. Некоторые таксономические проблемы в этом классе животных были решены с помощью данных о строении тритерпеновых гликозидов. Более того, в результате применения такого подхода был пересмотрен таксономический статус

некоторых видов [15, 17, 18]. Все предложенные нами ревизии отдельных таксонов были приняты научным сообществом.

Очень необычные гликозиды были выделены из голотурии *Synapta maculata*, которая является единственным химически изученным представителем отряда Apodida. Во-первых, выделенные из нее синаптозиды А и А₁ имеют в качестве терминального моносахаридного остатка 3-О-метилглюкуроновую кислоту, которая ранее никогда не встречалась ни в гликозидах голотурий, ни вообще в каких-либо тритерпеновых гликозидах. Во-вторых, синаптозид А₁ содержит уникальное полициклическое ядро с 7-оксо-8(9)-еновой системой. Таксономисты рассматривают отряд Apodida как эволюционно обособленный отряд в классе. Химические особенности синаптозидов хорошо согласуются с этой точкой зрения [19] (рис. 5).

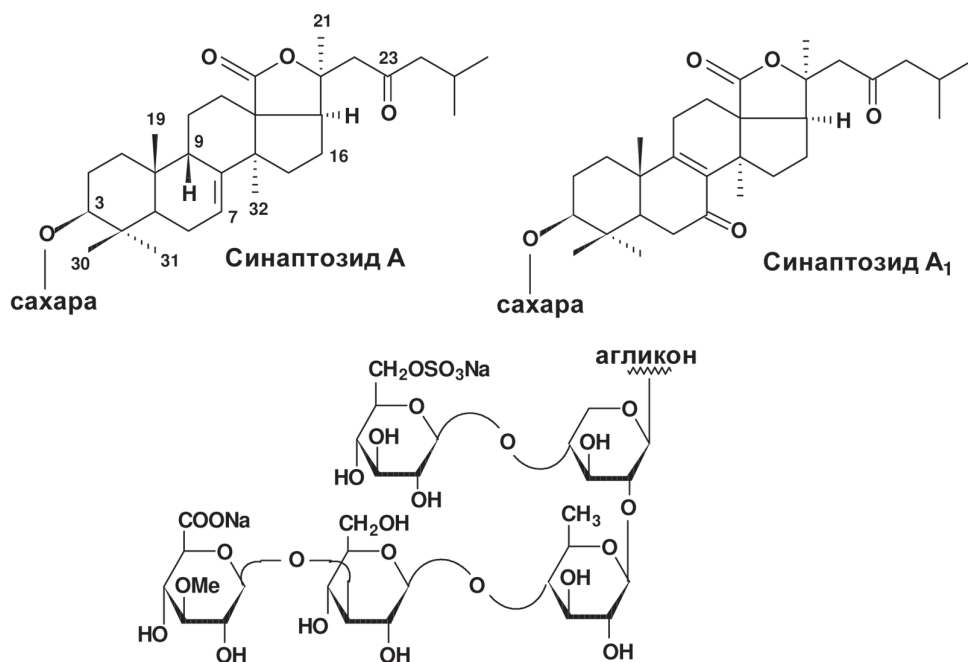


Рис. 5. Синаптозиды А и А₁ из голотурии *Synapta maculata* [19]

В течение последних лет основные усилия исследователей были направлены на изучение голотурий отряда Dendrochirotida, которые обычно содержат очень сложные смеси гликозидов. Благодаря современным подходам к разделению смесей близких по строению веществ недавно было выделено впечатляющее количество новых, главным образом, минорных тритерпеновых гликозидов. Некоторые из них имеют очень интересные структурные особенности.

Так, недавно из дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* нами было выделено 28 новых гликозидов. Семь из них относятся к кукумариозидам группы Н, имеющим пентаозидную разветвленную моносульфатированную углеводную цепь с редким терминальным остатком 3-О-метилсилозы и отличающимся друг от друга по структуре агликонов. Терминальный остаток 3-О-метилсилозы является хемотак-

сономическим маркером рода *Eupentacta* и крайне редко встречается у других голотурий [20, 21]. Кукумариозид H_3 имеет ланостановый агликон с 18 (16) -лактоном и укороченной боковой цепью [20], а кукумариозид H_8 содержит весьма необычную 16,22-эпоксигруппу в голостановом агликоне (рис. 6) [21].

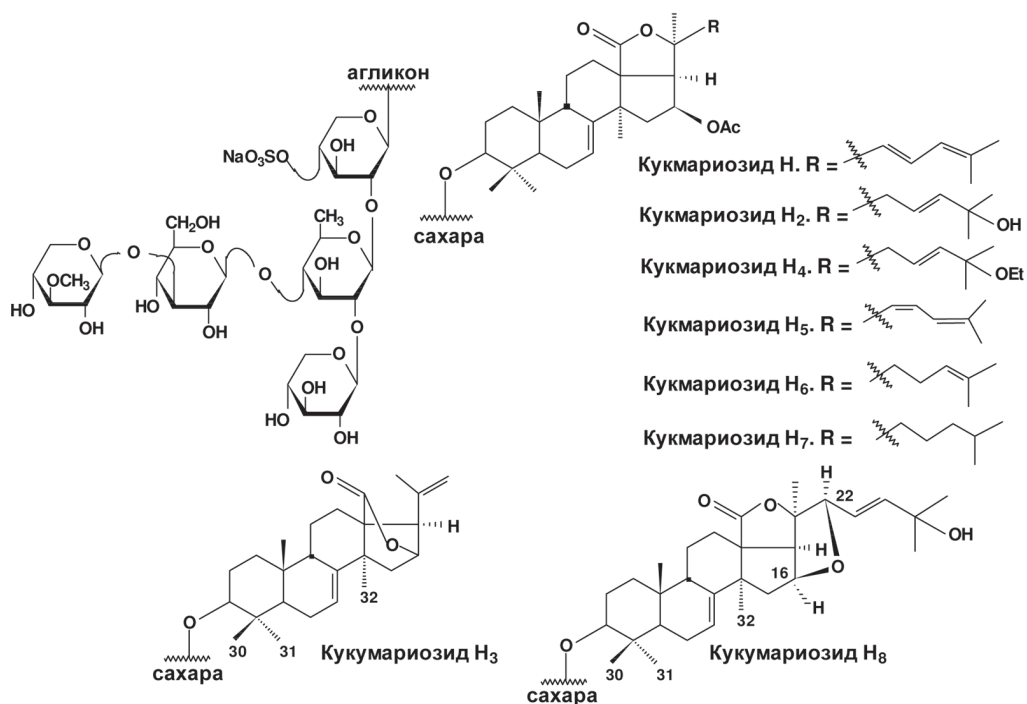


Рис. 6. Тритерпеновые гликозиды из голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Кукумариозиды группы H: кукумариозид H и кукумариозиды H_2 – H_8 [20, 21]

Два новых гликозида, кукумариозиды B_1 и B_2 , имеют беспрецедентные трисахаридные углеводные цепи [22]. Находки триозидов очень редки в голотуриях. К настоящему времени известно только два вида голотурий, в которых были найдены триозиды. Однако, их углеводные цепи отличаются от этих фрагментов кукумариозидов группы В как по общему плану строения, так и по составу. В частности, в неизвестном виде голотурий, который был некорректно описан как «*Telenata Ananas*», углеводная часть гликозида 1 состоит из одного остатка ксилозы, одного остатка хиновозы и одного остатка глюкозы. Хиновозный и глюкозный остатки соединены с ксилозой 1→2- и 1→4 β-гликозидными связями соответственно [23]. Таким образом, углеводная цепь гликозида разветвлена по первому (ксилозному) остатку. В пентактозидах I и II, триозидах из *Pentacta quadrangularis* первый ксилозный остаток содержит сульфатную группу, остаток хиновозы связан с ксилозой β-(1→2) -гликозидной связью, второй ксилозный остаток присоединен к хиновозе β-(1→4) -гликозидной связью, и, таким образом, углеводная цепь является линейной, но отличающейся по строению от таковой для кукумариозидов группы В (рис. 7) [24]. Следовательно, углеводные цепи кукумариозидов B_1 и B_2 являются уникальными.

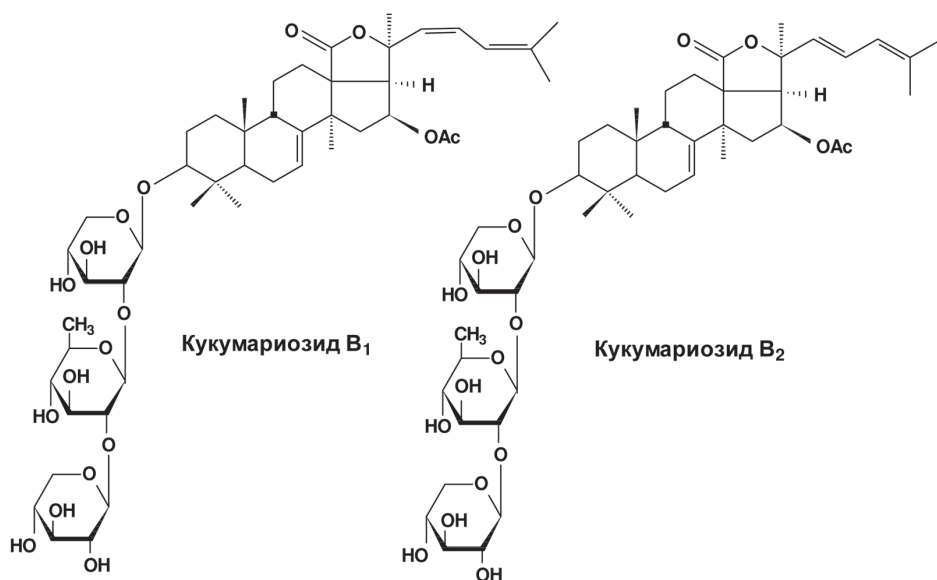


Рис. 7. Тритерпеновые гликозиды из голотурии *Eupentacta fraudatrix*.
Кукумариозиды группы В: кукумариозиды В₁ и В₂ [22]

Четыре других новых гликозида, кукумариозиды группы I, содержат пентаозидную разветвленную углеводную цепь с двумя сульфатными группами и 3-О-метилксилосой в качестве терминального моносахаридного остатка (рис. 8) [25, 26].

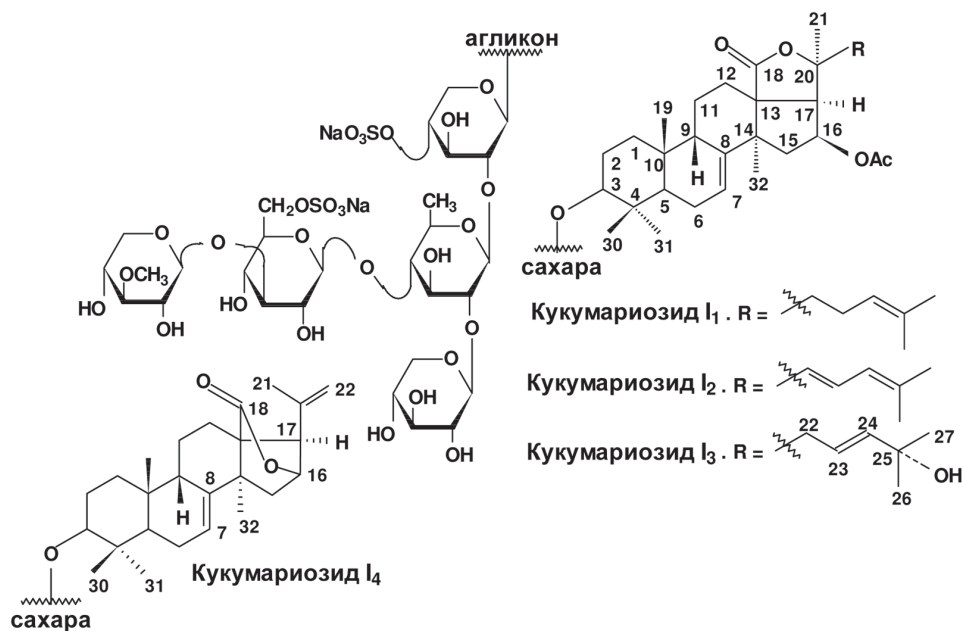


Рис. 8. Тритерпеновые гликозиды из голотурии *Eupentacta fraudatrix*.
Кукумариозиды группы I: кукумариозиды I₁–I₄ [25, 26]

И, наконец, пятнадцать новых гликозидов, кукумариозиды группы А, имеют линейную тетрасахаридную углеводную цепь без сульфатных групп (рис. 9) [27, 28]. Агликон кукумариозида A_6 включает в себя 23 E ,25-диеновую систему. Такой тип ненасыщенности впервые обнаружен у гликозидов голотурий [27]. Агликон кукумариозида A_{12} относится к 27-норланостановым производным, очень редким для гликозидов голотурий [27]. Интересно, что нахождение 27-норланостановых производных среди природных соединений из животного царства является одним из немногих таких примеров. Только четыре таких соединения были известны до настоящего времени, включая 26-нор-25-оксоголотоксин A_1 – нортритерпеновый гликозид из голотурии *Apostichopus japonicus* [29], выделенный китайскими исследователями практически одновременно с выделением нами кукумариозида A_{12} .

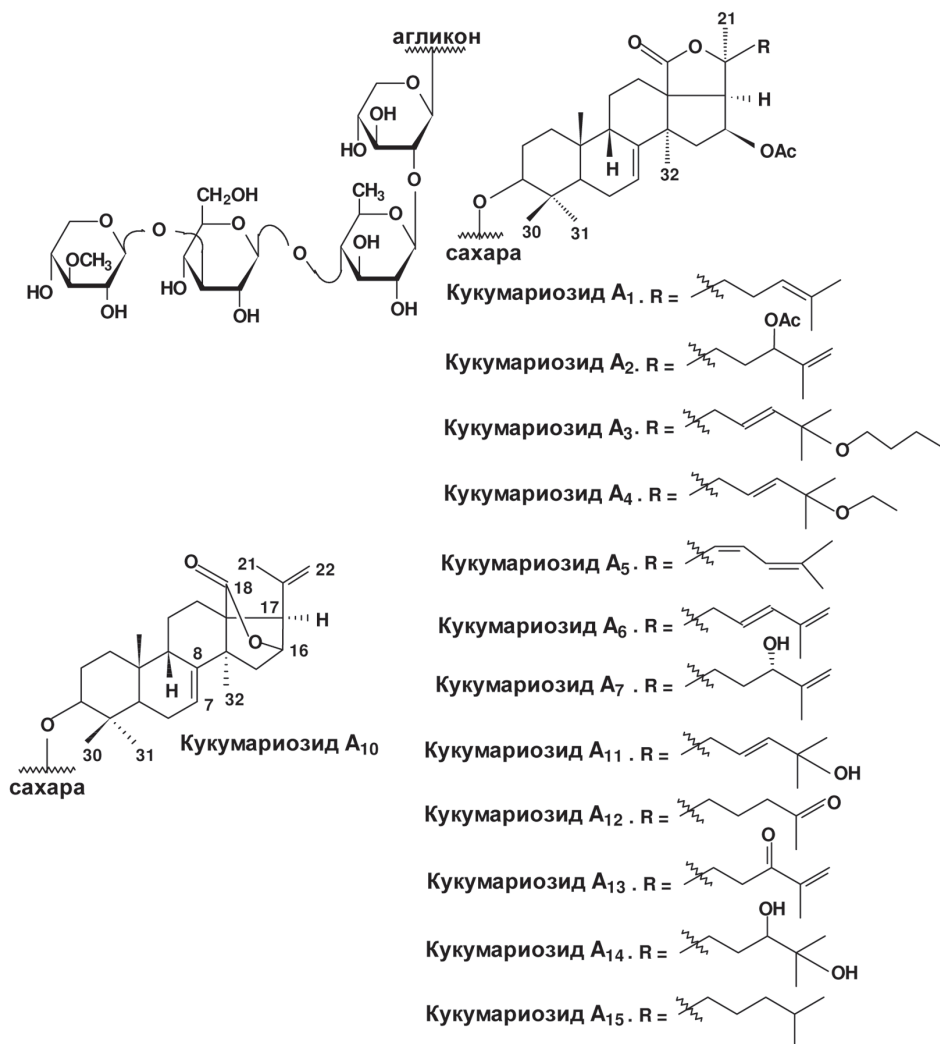


Рис. 9. Тритерпеновые гликозиды из голотурии *Eupentacta fraudatrix*.
Кукумариозиды группы А: кукумариозиды A_1 – A_7 и A_{10} – A_{15} [27, 28]

Кукумариозиды A_8 и A_9 имеют черты, характерные для всех аналогичных гликозидов из *E. fraudatrix*, однако обладают столь редкими структурными элементами, как две гидроксильные группы (при С-18 и С-20) вместо лактона (рис. 10) [30, 28]. Структуры агликонов этих веществ представляют особый интерес, поскольку эти гликозиды можно рассматривать как «горячие метаболиты» или биосинтетические предшественники более окисленных голостановых агликонов.

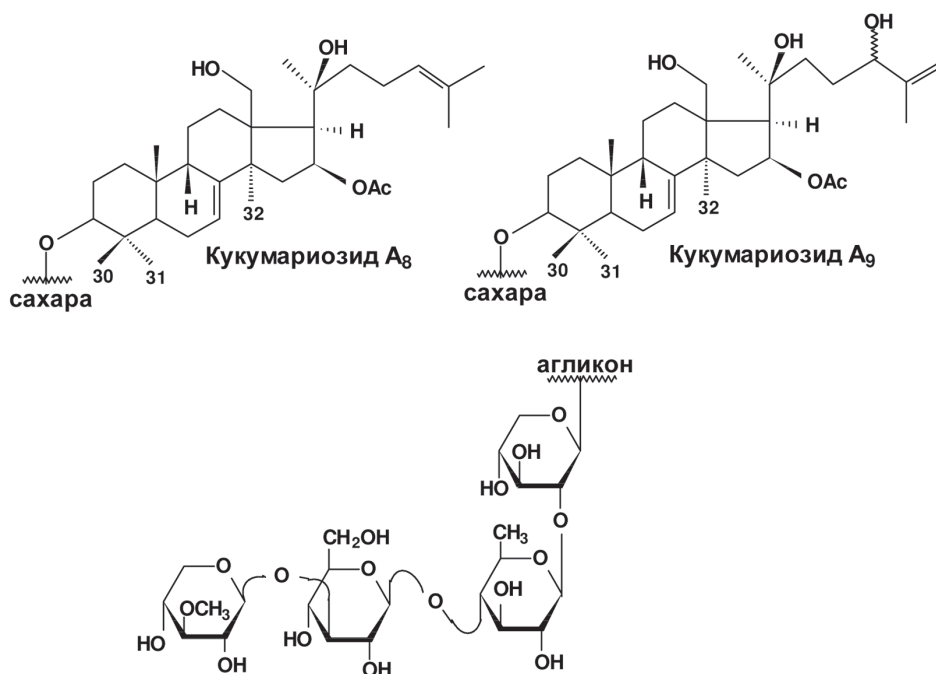


Рис. 10. Тритерпеновые гликозиды голотурии *Eupentacta fraudatrix*: кукумариозиды A_8 [30] и A_9 [28] – «горячие» метаболиты

Выделение минорных, так называемых метаболически активных веществ, является одним из подходов к изучению биосинтеза. Этот подход труден и редко применим, поскольку такие метаболиты обычно не успевают накапливаться. Однако, их выделение может давать дополнительную информацию, демонстрирующую последовательность событий в ходе биосинтеза. Таким образом, нам повезло найти такие «горячие» минорные метаболиты со структурами, которые могут помочь разъяснить некоторые особенности путей биосинтеза гликозидов в голотуриях.

Нахождение гликозидов с «неразвитыми» агликонами, но с нормальной тетра-сахаридной углеводной цепью, указывает, что как биосинтетическая модификация агликонной части, так и биосинтез углеводных цепей являются независимыми и параллельными последовательностями реакций, что характерно для природных соединений с мозаичным типом биосинтеза.

Редкая конфигурация 9β -H в агликонах кукумариозидов A_8 и A_9 также весьма интересна. Ее наличие предполагает, что эта структурная черта возникает на ранних стадиях образования агликона. Возможно, что это результат очень необычной стаби-

лизации простеринового катиона с отрывом протона не от С-9, а от С-7 с консервацией нестабильной конформации кольца В. Таким образом, ранее неизвестный 9 β -Н-ланоста-7,24-диен-3 β -ол является ключевым биосинтетическим предшественником гликозидов, содержащих 7 (8) -двойную связь (рис. 11). Недавно мы нашли аналогичные производные в голотурии *Cucumaria frondosa* [31].

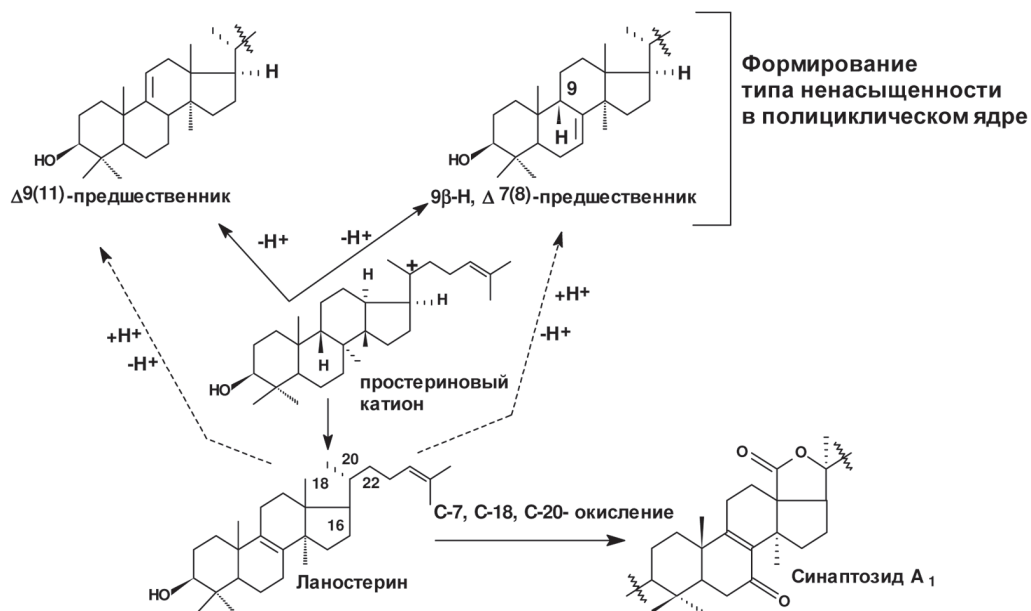


Рис. 11. Возможные биосинтетические предшественники тритерпеновых гликозидов голотурий

Более того, из *C. frondosa* были выделены три пары гликозидов, изомерных только по положению двойной связи в полициклическом ядре (рис. 12) [31]. Это свидетельствует в пользу наличия общего биосинтетического предшественника для обоих типов гликозидов, (имеющих 7 (8) – или 9 (11) -двойную связь) и образования полициклической системы с определенным типом ненасыщенности на начальных стадиях биосинтеза.

Другая возможность состоит в том, что ланостерин является предшественником некоторых из этих соединений, поскольку ранее отмечалось включение меченого ланостерина в гликозиды с 7 (8) – и 9 (11) -двойной связью. Синаптозид А₁ из *S. maculata* имеет 8 (9) -двойную связь (подобно ланостерину), а синаптозид А – 7(8)-двойную связь в агликоне. Это указывает на возможность того, что ланостерин является биосинтетическим предшественником некоторых 7(8)-ненасыщенных гликозидов.

Следующей стадией биосинтетических трансформаций является введение гидроксильной группы в положение 20, что отчасти подтверждается структурами пенавострозидов, гликозидов *Pentacta australis*, которые имеют наименее окисленные агликоны среди всех известных гликозидов голотурий. При биосинтезе голостановых гликозидов образование 18(20)-лактона идет через такое гидроксилирование и окис-

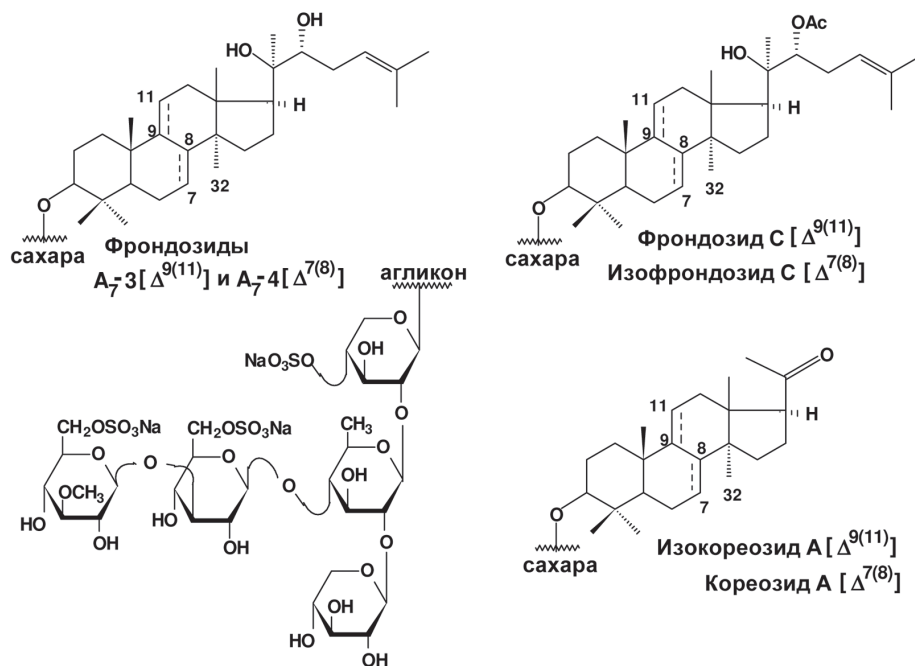


Рис. 12. Три пары гликозидов из голотурии *Cucumaria frondosa*, изомерных по положению двойной связи в циклической системе агликона: фрондозиды A_7-3 и A_7-4 [31]; фрондозид С и изофрондозид С [12, 31]; кореозид А и изокореозид А [31, 14, 32]

ление CH_3-18 до карбоксильной группы с последующей внутримолекулярной дегидратацией (рис. 13) [30].

Структуры кукумариозидов B_1 и B_2 , имеющих трисахаридную «неразвитую» углеводную цепь и «развитые» голостановые агликоны, также хорошо соответствуют мозаичному типу биосинтеза. Удлинение углеводной цепи происходит путем присоединения моносахаридных остатков в различные положения формирующейся олигосахаридной цепи. Это приводит к образованию тритерпеновых гликозидов с различными типами углеводных цепей. Так, биосинтез пентасахаридных разветвленных углеводных цепей может проходить двумя разными путями. Первый включает образование тетрасахаридного углеводного фрагмента с последующим присоединением терминальной ксилозы к С-2 второго моносахаридного остатка. Это подтверждается присутствием линейных тетраозидов в *E. fraudatrix*. Другой путь может включать первоначальное образование триозидной углеводной цепи с последующим удлинением углеводной цепи глюкозным и терминальным 3-О-метилксилозным остатками по С-4 второго моносахаридного остатка (рис. 14) [22].

Тритерпеновые гликозиды проявляют различные виды биологической активности, вызванной их мембранолитическим действием. Известно, что цитотоксическое действие гликозидов голотурий против различных клеточных мишеней зависит от их структуры приблизительно одинаково из-за сходного Δ^5 -стерин-зависимого механизма действия. Некоторые структурные элементы гликозидов значительно уменьшают,

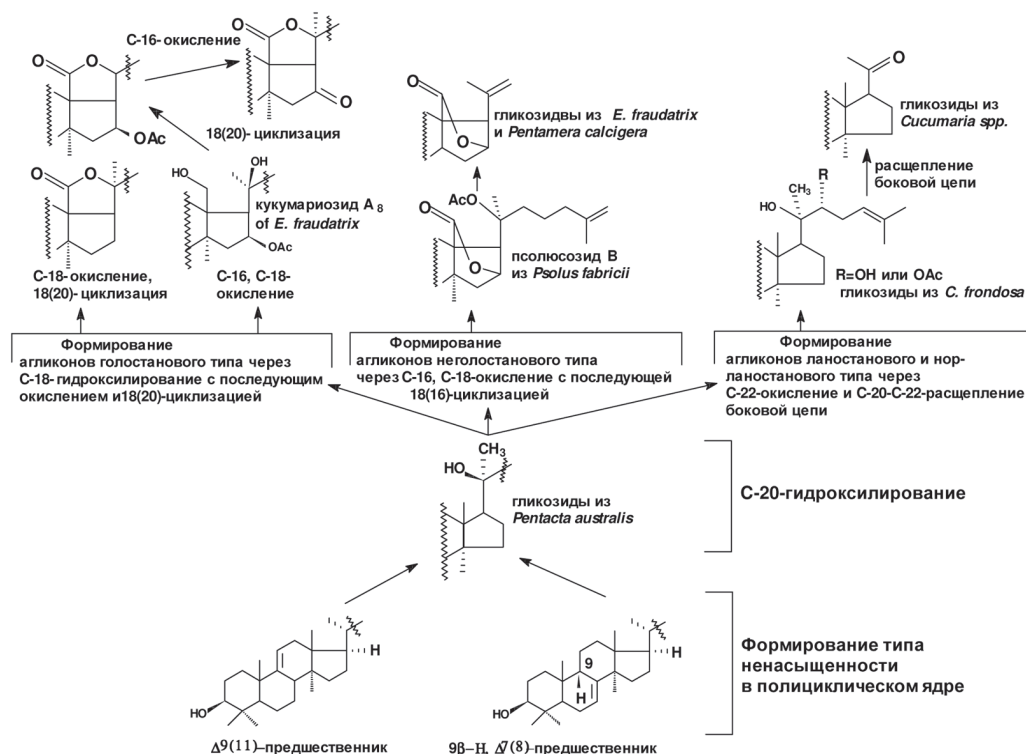


Рис. 13. – Предполагаемая схема биосинтеза тритерпеновых гликозидов в голотуриях [30]

а некоторые, наоборот, увеличивают биологическую активность тритерпеновых гликозидов [33].

Мы изучили цитотоксическую активность гликозидов из *E. fraudatrix* на лимфоцитах селезенки мыши, клетках асцитной формы карциномы Эрлиха, а также гемолитическое действие на эритроциты мыши. Кукумариозиды Н₂, А₁₁, и I₃, имеющие идентичные агликоны с гидроксильной группой при С-25 и отличающиеся по структуре углеводных цепей, не проявляют какой-либо цитотоксической и гемолитической активности [20, 28, 26]. Присутствие гидроксильной группы при С-24 в некоторых кукумариозидах также ведет к отсутствию какой-либо активности. Таким образом, наличие гидроксильных групп в боковых цепях агликонов гликозидов существенно уменьшает активность. Однако, очень интересно, что замещение гидроксила при С-25 этоксильной группой (в кукумариозидах Н₄ и А₄) вызывало заметное увеличение активности [20, 27], в то время как замещение гидроксила бутоксильной группой (в кукумариозиде А₃) почти не влияло на активность.

Сравнение биологической активности кукумариозидов А₁, Н₆ и I₁, имеющих тот же самый агликон, показало зависимость биологического действия от структуры углеводной цепи [25]. Кукумариозид А₁, имеющий линейную тетрасахаридную углеводную цепь, был наиболее активным веществом в этой серии. В то же время, кукумариозиды Н₆ и I₁, имеющие разветвленную пентасахаридную углеводную цепь, демонстрировали слабый цитотоксический и гемолитический эффекты соответственно.

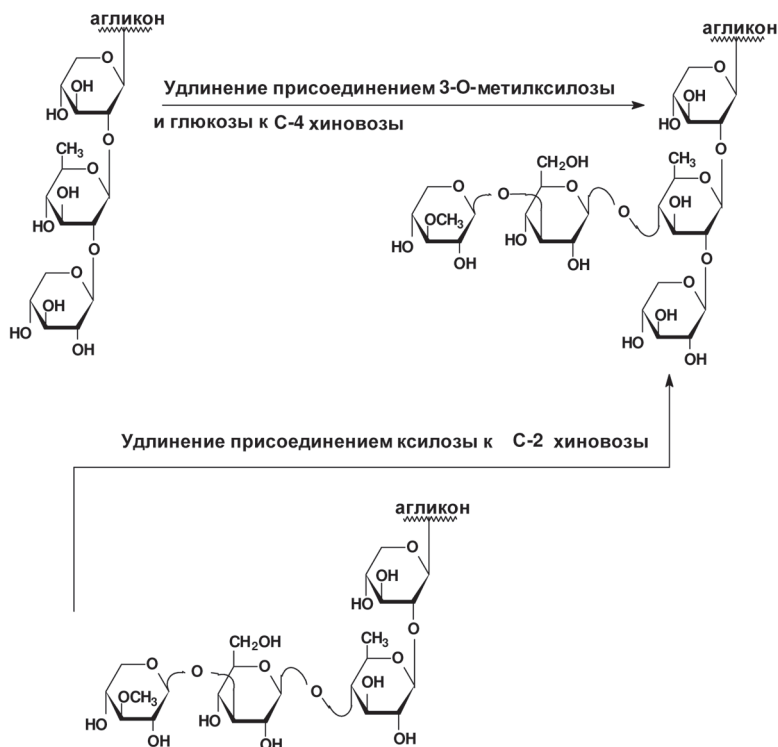


Рис. 14. Варианты биосинтеза пентасахаридных углеводных цепей в *Eupentacta fraudatrix* [22]

Хорошо известно, что наличие линейного тетрасахаридного фрагмента очень важно для различных видов биологической активности гликозидов голотурций, зависящих от их мембранолитического действия. Известно также, что концевой моносахаридный остаток, прикрепленный к С-2 второго моносахаридного остатка, уменьшает активность. Разница в силе цитотоксического действия между кукумариозидами I_1 и H_6 может быть объяснена наличием дополнительной сульфатной группы в углеводной цепи кукумариозидов группы I , что уменьшает их активность по сравнению с кукумариозидами группы H .

Сравнение биологических активностей серий кукумариозидов групп H и B , имеющих те же самые агликоны, хорошо согласуются с более ранними наблюдениями. Кукумариозиды B_1 и B_2 [22] были менее активны во всех тестах при сравнении с кукумариозидами H_5 и H [21], что указывает на значительный вклад линейного тетрасахаридного фрагмента в биологическую активность гликозидов.

Однако мы наблюдали и некоторые исключения из тенденций, упомянутых выше, и касающихся сходного биологического действия гликозидов на различные клеточные мишени. Например, кукумариозид A_{12} демонстрировал низкую цитотоксическую активность против клеток асцитной формы карциномы Эрлиха, но проявлял значительный цитотоксический эффект на лимфоцитах селезенки мыши и гемолитический эффект на эритроцитах мыши [27]. Для кукумариозидов H_3 и A_5 наблюдалась сходная закономерность [20, 27]. Такие различия в активностях на различных тестах

могут быть объяснены особенностями химического состава клеточных мембран различных типов.

Было удивительно, что кукумариозид A_8 , не имеющий 18 (20) -лактона, является очень активным [28], поскольку известно, что наличие лактона очень важно для мембранотропного действия гликозидов [33, 34]. Возможно, это связано с образованием внутримолекулярных водородных связей в агликоне, обеспечивающих конформацию, близкую к таковой для голостановых производных, но этот вопрос требует специального исследования. В то же время, кукумариозид A_9 , имеющий дополнительную гидроксильную группу в боковой цепи, был неактивен во всех этих тестах [28].

Помимо эффектов, связанных с Δ^5 -стерин-зависимым мембранолитическим действием, тритерпеновые гликозиды голотурий обладают рядом интересных свойств, проявляющихся в субцитотоксических дозах, включая иммуномодулирующую и противоопухолевую активности. Ряд этих веществ являются эффективными иммуномодуляторами, а некоторые гликозиды обладают противоопухолевым действием *in vivo*, они могут также ингибировать клеточную пролиферацию и вызывать индукцию апоптоза в субцитотоксических дозах. Эти вещества могут ингибировать множественную лекарственную устойчивость в нецитотоксических дозах. Изучение активности гликозидов, не зависящей от их взаимодействия с мембранными Δ^5 -стеринами, является новой и быстроразвивающейся областью исследований [35].

Таким образом, тритерпеновые гликозиды голотурий являются уникальным классом морских природных соединений. Выделение нами недавно почти трех десятков ранее неизвестных соединений этой серии из голотурий *E. fraudatrix* существенно расширило число известных гликозидов. Можно предположить, что разнообразие этих веществ является следствием мозаичного типа их биосинтеза, причем, как агликонная, так и углеводная компоненты гликозидов образуются не в результате строго детерминированных последовательностей химических превращений. Наоборот, отдельные химические события могут протекать в разных последовательностях, а также одновременно и в агликонной, и в углеводной частях молекул.

В целом, гликозиды голотурий обладают различными видами биологической активности, что определяет возможность их использования для создания новых лекарственных средств, включая противоопухолевые и иммуностимулирующие препараты. Кроме того, специфичность строения гликозидов для различных таксонов создает возможность их использования для целей систематики голотурий. Обнаружение гликозидов, имеющих новые структурные особенности, обеспечивает расширение знаний о биохимическом разнообразии природных соединений в целом. Несмотря на то, что изучение гликозидов голотурий ведется уже несколько десятков лет, их структурное разнообразие позволяет ожидать новых и интересных находок в части обнаружения новых веществ этого класса.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-546.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Habermehl G., Volkvein G.* // *Toxicon*. 1971. V. 9. P. 319–326.
2. *Kitagawa I., Nishino T., Kobayashi M., Kyogoku Y.* // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29, No. 7. P. 1951–1956.
3. *Kitagawa I., Nishino T., Kobayashi M., Matsuno T., Akutsu H., Kyogoku Y.* // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29, No. 7. P. 1942–1950.
4. *Maltsev I.I., Stonik V.A., Kalinovskiy A.I., Elyakov G.B.* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1984. V. 78B, No. 2. P. 421–426.
5. *Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A.* // *J. Nat. Toxins*. 1999. V. 8, No. 2. P. 235–248.
6. *Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A., Smirnov A.V.* // *Phytochem. Rev.* 2005. V. 4, No. 2–3. P. 221–236.
7. *Стоник В.А., Мальцев И.И., Калиновский А.И., Кондэ К., Еляков Г.Б.* // *Химия природ. соедин.* 1982. № 2. С. 194–199.
8. *Стоник В.А., Мальцев И.И., Калиновский А.И., Еляков Г.Б.* // *Химия природ. соедин.* 1982. № 2. С. 200–204.
9. *Мальцев И.И., Стоник В.А., Калиновский А.И.* // *Химия природ. соедин.* 1983. № 3. С. 308–312.
10. *Афиятуллов Ш.Ш., Тищенко Л.Я., Стоник В.А., Калиновский А.И., Еляков Г.Б.* // *Химия природ. соедин.* 1985. № 2. С. 244–248.
11. *Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А., Дмитренко П.С., Елькин Ю.Н.* // *Химия природ. соедин.* 1989. № 3. С. 361–368.
12. *Avilov S.A., Drozdova O.A., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., Stonik V.A., Gudimova E.N., Riguera R., Jimenez C.* // *Can. J. Chem.* 1998. V. 76, No. 2. P. 137–141.
13. *Avilov S.A., Kalinin V.I., Makarieva T.N., Stonik V.A., Kalinovskiy A.I.* // *J. Nat. Prod.* 1994. V. 57, No. 8. P. 1166–1171.
14. *Avilov S.A., Kalinovskiy A.I., Kalinin V.I., Stonik V.A., Riguera R., Jimenez C.* // *J. Nat. Prod.* 1997. V. 60, No. 8. P. 808–810.
15. *Avilov S.A., Kalinin V.I., Smirnov A.V.* // *Biochem. Syst. Ecol.* 2004. V. 32. P. 715–733.
16. *Rodriguez J., Castro R., Riguera R.* // *Tetrahedron*. 1991. V. 47, No. 26. P. 4753–4762.
17. *Левин В.С., Калинин В.И., Стоник В.А.* // *Биология моря*. 1984. № 3. С. 33–38.
18. *Moraes G., Northcote P.T., Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Levin V.S.* // *Biochem. Syst. Ecol.* 2004. V. 32. P. 637–650.
19. *Avilov S.A., Silchenko A.S., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., Smirnov A.V., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Fedorov S.N., Savina A.S., Shubina L.K., Stonik V.A.* // *J. Nat. Prod.* 2008. V. 71, No. 4. P. 525–531.
20. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Res.* 2012. V. 26, No. 19. 1765–1774.
21. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Com.* 2011. V. 6, No. 6. 1075–1082.
22. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Com.* 2012. V. 7, No. 9. P. 1157–1162.
23. *Hegde V.R., Chan T.-M., Pu H., Gullo V.P., Patel M.G., Das P., Wagner N., Parameswaran P.S., Naik C.G.* // *Bioorg. Med. Chem. Letters*. 2002. V. 12. P. 3203–3205.
24. *Han H., Xu Q.-Z., Tang H.-F., Yi Y.-H., Gong W.* // *Planta Med.* 2010. V. 76. P. 1900–1904.
25. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., Aminin D.L., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Res.* 2013. V. 27, No. 19. P. 1776–1783.
26. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Com.* 2013. V. 8, No. 8. P. 1053–1058.
27. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Com.* 2012. V. 7, No. 4. P. 517–525.

28. *Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I.* // *Nat. Prod. Com.* 2012. V. 7, No. 7. P. 845–852.
29. *Wang Z., Zhang H., Yuan W., Gong W., Tang H., Liu B., Krohn K., Li L., Yi Y., Zhang W.* // *Food Chem.* 2012. V. 132. P. 295–300.
30. *Silchenko A.S., Kalinonovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjashenko P.V., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Stonik V.A.* // *Biochem. Syst. Ecol.* 2012. V. 44. P. 53–60.
31. *Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Morre J., Deinzer M.L., Woodward C., Collin P.D.* // *Can. J. Chem.* 2007. V. 85, No. 9. P. 626–636.
32. *Avilov S.A., Antonov A.S., Silchenko A.S., Kalinin V.I., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Riguera R., Jimenes C.* // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66, No. 7. P. 910–916.
33. *Kalinin V.I.* // *J. Theor. Biol.* 2000. V. 206. P. 151–168.
34. *Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A.* // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. V. 35. P. 135–196. The Netherlands: Elsevier Science Publisher, 2008.
35. *Aminin D.L., Pisyagin E.A., Menchinskaya E.S., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I.* // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. V. 41. P. 73–91. The Netherlands: Elsevier Science Publisher, 2014.

О-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОЛИСАХАРИДЫ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МОРСКИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

М. С. Кокоулин¹, С. В. Томшич, Н. А. Командрова

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

Представлены структуры О-специфических полисахаридов из липополисахаридов морских грамотрицательных бактерий, принадлежащих к родам *Shewanella*, *Cellulophaga*, *Arenibacter*, *Litorimonas*, *Oceanisphaera*. Отличительной особенностью этих полисахаридов является наличие необычных кислых и N-ациламиносахаров, а также заместителей неуглеводной природы.

Ключевые слова: липополисахарид; О-специфический полисахарид; морские бактерии.

O-specific polysaccharides of some marine gram-negative bacteria. M. S. Kokoulin¹, S. V. Tomshich, N. A. Komandrova (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100-let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The chemical structures of the O-specific polysaccharides isolated from lipopolysaccharides of marine gram-negative bacteria belonging to the genera *Shewanella*, *Cellulophaga*, *Arenibacter*, *Oceanisphaera*, *Litorimonas* have been reviewed. These polysaccharides are characterized by their acidic character as well as by presence of unusual sugars and various uncommon non-sugar substituents.

Keywords: lipopolysaccharide; O-specific polysaccharide; marine bacteria

Грамотрицательные бактерии являются важнейшим компонентом морских экосистем. Морские микроорганизмы, миллионы лет адаптируясь к выживанию в достаточно суровой среде, характеризующейся экстремальными физическими и химическими параметрами (давление, температура, соленость и т.д.), занимают различные экологические ниши. Ареалы их обитания разнообразны и охватывают прибрежные и открытые акватории океанов, глубоководные и гидротермальные впадины, грунты; многие виды являются ассоциантами беспозвоночных, рыб, водорослей или морских трав [1]. Основной интерес к исследованию морских бактерий обусловлен их способностью продуцировать биологически активные соединения, такие как антибиотики, токсины, эндотоксины (липополисахариды, ЛПС), антиопухолевые и антибактериальные вещества, имеющие фармакологический и биотехнологический потенциал. Кроме того, морские бактерии, имея особые пути метаболизма, обладают способностью к биологической очистке окружающей среды от загрязнителей.

¹ Автор для связи (+7 (423) 231-07-19; эл. почта: maxchem@mail.ru).

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид.

Особое место среди продуцентов морских грамотрицательных бактерий занимают ЛПС, которые, в отличие от ЛПС наземных бактерий часто проявляют низкую токсичность и могут стать потенциально активными субстанциями при разработке новых лекарств для предотвращения септического шока и создания эффективных иммуномодуляторов. В связи с этим структурное исследование ЛПС морских грамотрицательных бактерий актуально и имеет большое значение.

ЛПС являются одним из основных компонентов внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Они известны как основные антигены бактериальной клетки; играют важную роль в специфичности каналов, ответственных за транспорт необходимых для роста клетки веществ; защищают ее от летального действия детергентов, ядов, некоторых антибиотиков; являются рецепторами для ряда специфических бактериофагов и бактериоцинов. Ключевую роль играют эти вещества и в процессах межклеточного узнавания. Многие патофизиологические проявления грамотрицательных инфекций, в том числе эндотоксемия и бактериальный шок, ассоциированы с уникальными, эндотоксическими свойствами этих углеводсодержащих биополимеров.

Антигенной детерминантой ЛПС является *O*-специфический полисахарид, который в случае патогенных штаммов распознается антителами иммунной системы. Особые структурные изменения и структурные перестройки, происходящие в ОПС в процессе биосинтеза, могут нарушить специфическое связывание полисахарида с антителами, маскируя бактериальную колонизацию и инфекцию [2].

Молекула ЛПС состоит из трех фрагментов, ковалентно связанных друг с другом: консервативной части – липида А (практически одинакового для большинства грамотрицательных бактерий); относительно консервативного олигосахаридного компонента («коровой» зоны) и высоковариабельной полисахаридной цепи (ОПС), имеющей уникальное строение у каждого вида микроорганизмов и определяющей их специфичность [3].

Антигены грамотрицательных бактерий исследованы крайне неравномерно. Наряду с довольно хорошо изученными полисахаридными антигенами энтеробактерий и некоторых псевдомонад, существуют менее изученные и совсем неизученные таксоны микроорганизмов. К ним можно отнести практически все микроорганизмы морского происхождения, хотя по количеству и разнообразию они не уступают, а скорее превосходят наземные виды бактерий.

Морские микроорганизмы, находясь в весьма специфических условиях обитания, естественно, отличаются от наземных форм рядом приспособительных функций. Прежде всего, это относится к клеточной стенке бактерий, в которой ЛПС играет определяющую роль во взаимодействии микроорганизма с окружающей средой. Именно структура этих особых и жизнеобеспечивающих молекул является отражением функциональных изменений, вызванных средой обитания.

Первые работы по структурному исследованию *O*-антигенов морских грамотрицательных бактерий появились в 80-е годы прошлого столетия, и в настоящее время число их неуклонно растет. Имеющиеся на настоящий момент данные показывают, что клеточные стенки морских грамотрицательных бактерий различных родов и видов продуцируют антигены уникального строения. Эти биополимеры содержат необычные кислые моносахариды, *N*-ациламино- и кетосахара, высшие моносахариды, а

также различные заместители неуглеводной природы [4-7]. В составе антигенных полисахаридов различных представителей наиболее изученного рода *Pseudoalteromonas* обнаружены такие редкие производные гексоз, как 3,6-дидезокси-*L*-ксило-гексоза, колитоза (*P. tetraodonis*, *P. carrageenovora*), 4-О-ацетил-6-дезокси-*L*-талоza (*P. flavipulchra*), 4-ацетамидо-4,6-дидезокси-*D*-глюкоза, N-ацетил-*D*-виозамин (*P. aliena*), 3-(N-ацетил-*D*-аланил)амино-3,6-дидезокси-*D*-глюкоза (*P. haloplanktis*), 2-(N-ацетил-*L*-треонил)амино-2,6-дидезокси-*D*-галактоза (*P. agarivorans*); высшие сахара (изомеры псевдаминовой кислоты) – 5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*L*-манно-нон-2-улозоновая кислота, ди-N-ацетилпсевдаминовая кислота (*P. atlantica*) и 5-ацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-7-формамидо-*L*-глицеро-*L*-манно-нонулозоновая кислота (*P. distincta*); кетосахар, 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*D*-ксило-гексоз-4-улоза (*P. rubra*), а также впервые идентифицированы два необычных амида аминокислоты (серина) с уроновыми кислотами – N-(2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-маннууроноил)-*L*-серин и N-(*D*-глюкуроноил)-*L*-серин (*P. aliena*) [4-7].

Проведенный нами структурный анализ гидрофобного полисахарида *Shewanella putrefaciens* А6 показал, что этот гликополимер построен из остатков двух уникальных сахаров: 5-ацетамидо-7-ацетамидино-8-О-ацетил-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*D*-галакто-нон-2-улозоновой (8-эпи-легионаминовой) кислоты и нового моносахарида с разветвленной боковой цепью – 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-4-С-(3'-карбоксамидо-2',2'-дигидроксипропил)-*D*-галактопиранозы, названного шеванеллозой. Кроме того, в составе антигенных полисахаридов морских протеобактерий идентифицирован целый ряд необычных аминсахаров. К ним относятся 4-ацетамидо-4,6-дидезокси-*D*-галактоза (*D*-томозамин), N-ацетил-*D*-бациллозамин (*Shewanella japonica*), аминсахара со свободной амингруппой (4-амино-4,6-дидезокси-*D*-глюкоза, 2-амино-2-дезокси-*L*-гулууроновая кислота, *Idiomarina zobellii*) а также необычная аминокислота – N^c-[(*S*)-1-карбокситил]-*L*-лизин (аланинолизин) (*Shewanella fidelis*) [4-7].

Анионный характер О-специфических полисахаридов морских бактерий связан с процессом адаптации к морской окружающей среде, поскольку наличие отрицательно заряженных участков в полисахаридной цепи способствует ионному взаимодействию с катионами двухвалентных металлов. Эти ионные мостики делают более компактной общую упаковку мембраны, обеспечивая тем самым большую устойчивость молекулы к внешним факторам морской среды, таким, например, как повышенное давление.

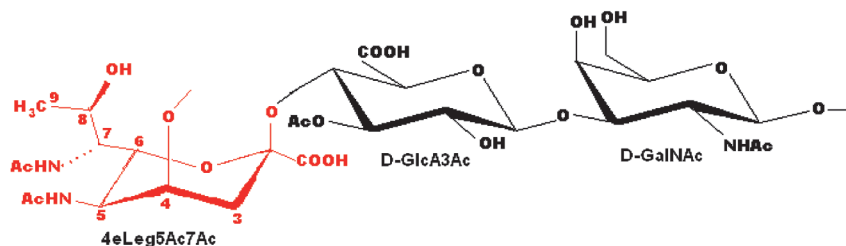
Основные результаты проведенных нами структурных исследований по О-антигенам морских грамотрицательных бактерий представлены в обзорных статьях [4-7]. В настоящем сообщении будут описаны структуры ОПС из ЛПС морских бактерий, установленные в последние годы в нашей лаборатории. В частности, структуры ОПС бактерий, принадлежащих к родам *Shewanella*, *Cellulophaga*, *Arenibacter*, *Oceanisphaera*, *Litorimonas*.

Род *Shewanella* в настоящее время включает в себя 54 вида грамотрицательных факультативных анаэробных протеобактерий, ассоциированных, главным образом, с водной средой обитания. Бактерии этого рода привлекают особое внимание в связи с их важной ролью в процессах кометаболической биологической очистки от галогенорганических загрязнителей [8], деструктивного окисления сырой нефти [9] и диссимиляционного восстановления оксидов магния и железа [10]. Сведения об установленных ранее структурах поверхностных полисахаридов некоторых видов *Shewanella*

приведены в обзорных статьях [4, 6]. В настоящей работе приводятся данные по структурной характеристике ОПС из морской бактерии *Shewanella japonica*.

Штамм *S. japonica* КММ 3601 был выделен из образца морской воды с глубины 0.5-1.5 м (бухта Троицы, залив Петра Великого Японского моря). Традиционная деградация ЛПС в мягких кислотных условиях для отщепления липида А от углеводной части не привела к получению полисахарида вследствие расщепления О-полисахаридной цепи по кислотолабильной гликозидной связи альдулозоновой кислоты. Поэтому в дальнейшем липополисахарид обрабатывали водным аммиаком в мягких условиях, что привело к О-дезацилированному липополисахариду, мягкой кислотной деградацией которого был получен О-дезацетилированный олигосахарид.

Исходный и О-дезацилированный ЛПС, а также выделенный олигосахарид (трисахарид), представляющий собой дезацетилированное повторяющееся звено ОПС, были изучены с помощью углеводного анализа и ЯМР-спектроскопии с использованием двумерных экспериментов. На основании полученных данных было установлено, что ОПС из ЛПС *S. japonica* КММ 3601 имеет следующую структуру [11]:

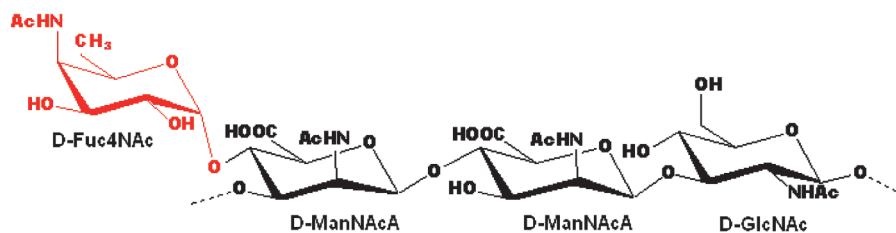


Полисахарид содержит редкий высший сахар – 5,7-диацетида-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D*-глицеро-*D*-мало-нон-2-улозоновую кислоту (производное 4-эпи-легионаминовой кислоты, 4eLeg), впервые обнаруженный в природе. Гомополимер 5-*N*-ацетимида-7-*N*-ацетильного производного 4-эпи-легионаминовой кислоты (4eLeg) был найден ранее в липополисахариде бактерий *Legionella pneumophila*, не входящих в серогруппу 1 [12].

Род *Cellulophaga* относится к семейству *Flavobacteriaceae*, типу *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* и включает в себя семь видов: *C. algicola*, *C. baltica*, *C. fucicola*, *C. lytica*, *C. pacifica* [13], *C. tyrosinioxidans* [14] и *C. geojensis* [15].

Ранее нами были установлены структуры ОПС из ЛПС *C. baltica* [16], *C. fucicola* [17]. Кислый характер изученных полисахаридов определяется присутствием уроновой (глюкуроновая в *C. baltica*) и нонулозоновой (псевдоаминовая в *C. fucicola*) кислот. В настоящей работе приводятся данные по структуре ОПС из морской бактерии *C. pacifica*.

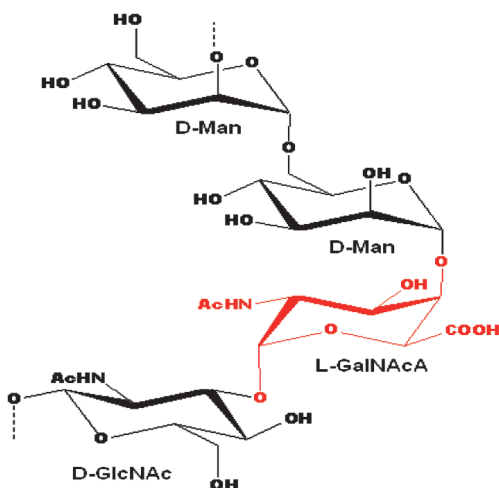
Штамм КММ 3664^T *C. pacifica* был выделен из образца морской воды, собранной на глубине 5 м в заливе Петра Великого Японского моря. ОПС *C. pacifica* был получен при мягкой кислотной деградации ЛПС, выделенного из сухих бактериальных клеток горячей фенол-водной экстракцией. На основании данных моносахаридного анализа, распада по Смит, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии высокого разрешения установлено, что ОПС построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев и имеет следующее строение [18]:



Среди известных структур бактериальных полисахаридов данная структура является уникальной: все четыре моносахаридных остатка в полисахариде представлены аминасахарами, причем два из них, *D*-маннозаминуриновая кислота и 4-ацетамидо-4,6-дидезокси-*D*-галактоза, являются редкими и ранее были обнаружены только однажды в составе энтеробактериальных антигенов [19].

Род *Arenibacter*, относящийся к семейству *Flavobacteriaceae* [20], включает шесть видов: *A. latericius*, *A. troitsensis*, *A. certesii*, *A. palladensis*, *A. echinorum*, *A. nanhaiticus* [21-26]. Микроорганизмы этого рода представляют собой грамотрицательные, аэробные, гетеротрофные с темно-оранжевым пигментом морские бактерии, которые были выделены из различных объектов, включая образцы грунта, бурые и зеленые водоросли *Chorda filum*, *Ulva fenestrata*, голотурии *Apostichopus japonicus*, морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. До настоящего времени ОПС липополисахаридов бактерий этого рода не изучались, хотя в литературе есть данные по структурной характеристике углеводной части липоолигосахарида, выделенного из бактерии *A. certesii* КММ 3941^Т [27].

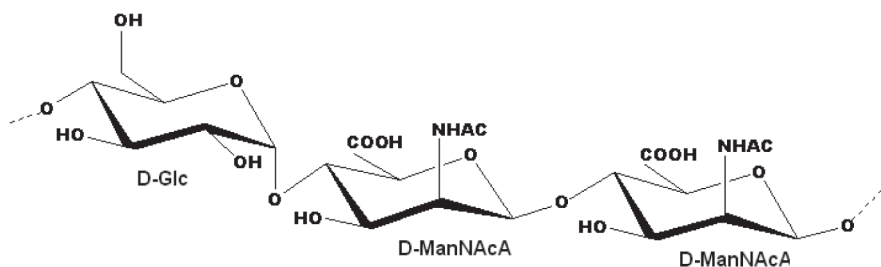
Выбранный нами для дальнейшего исследования типовой штамм морской бактерии *A. palladensis* КММ 3961^Т выделен из зелёной водоросли *Ulva fenestrata*, собранной в бухте Паллада залива Петра Великого Японского моря. ОПС был получен мягким кислотным гидролизом ЛПС и изучен с помощью химических методов анализа и ¹H- и ¹³C-ЯМР спектроскопии высокого разрешения. Показано, что полисахарид построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка *D*-маннозы и по одному остатку 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы и 2-ацетамидо-2-дезокси-*L*-галактуроновой кислоты, и имеет следующую структуру [28]:



Этот полисахарид, как и большинство ОПС из ЛПС морских бактерий, имеет кислый характер и содержит в своем составе редко встречающийся моносахарид 2-ацетамидо-2-дезоксид-*L*-галактурановую кислоту.

Следующим объектом наших исследований стал штамм КММ 3654^T, который был выделен из образца морской воды, собранной в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря, и описан как новый род и вид гаммапротеобактерий – *Oceanisphaera litoralis* [29]. В настоящее время род *Oceanisphaera* включает пять валидно описанных видов бактерий: *O. litoralis*, *O. donghaensis*, *O. arctica*, *O. sediminis*, *O. ostreae* [29-32]. Данных о структурных исследованиях ЛПС этих микроорганизмов в литературе нет.

ОПС липополисахарида морской протеобактерии *O. litoralis* КММ 3654^T построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих остаток *D*-глюкозы и два остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-маннуроновой кислоты, и имеет следующую структуру [33]:

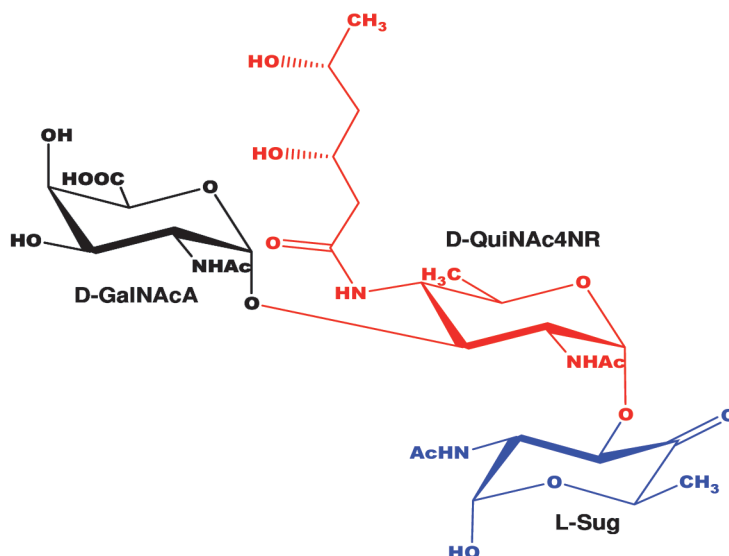


Полисахарид имеет кислый характер и содержит остатки редко встречающегося моносахарида – 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-маннуроновой кислоты.

Штамм G5^T, выделенный из образца пляжного песка бухты Таеан (Южная Корея), был описан как новый род и вид семейства *Hyphomonadaceae* класса *Alphaproteobacteria* – *Litorimonas taeanensis* [34] на основании филогенетических, фенотипических, хемотаксономических и молекулярных свойств. На данный момент род *Litorimonas* представлен двумя валидно описанными видами: *L. taeanensis* и *L. cladophorae* [34, 35]. Сведений по структурам О-антигенов морских граммотрицательных альфапротеобактерий в литературе практически нет, за исключением бактерий *Sulfitobacter brevis* КММ 6006 [36] и *Loktanella rosea* КММ 6003^T [37].

ОПС *L. taeanensis* G5^T построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактурановой кислоты (*D*-GalNAcA), 2-ацетамидо-4-((3*S*,5*S*)-3,5-дигидроксигексанамидо)-2,4-дидезокси-*D*-хиновозы (*D*-QuiNAc4NR) и 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*L*-ксило-гексоз-4-улозы (*L*-Sug), и имеет следующую структуру (см. ниже) [38].

Для определения хиральных центров в 3,5-дигидроксид-бутановой кислоте, входящей в состав ОПС *L. taeanensis* G5^T, был применен метод получения эфиров Мошера с использованием *R*-, *S*-α-метокси-α-трифторметил-α-фенилацетилхлорида (МТРА) [39]. Применение МТРА-эфиров для определения абсолютной конфигурации хиральных центров неуглеводных заместителей в химии биогликанов был применен нами впервые.



Отличительной особенностью данного полисахарида является одновременное присутствие в его составе двух редко встречающихся в природе сахаров: кетосахара *L*-Sug и производного хиновозы *D*-QuiNAc4NR. Такой же кетосахар, только с абсолютной *D*-конфигурацией, был обнаружен в составе ОПС *Flavobacterium columnare* ATCC 43622 [40], *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570 [41] и капсульных полисахаридов *Vibrio ordalii* O:2 [42], *Streptococcus pneumoniae* type 5 [43] и *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 [44]. Интересно отметить, что во всех этих полисахаридах, за исключением последнего, 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*D*-ксило-гексоз-4-улоза гликозилирует в положение 4 моносахарид с β -*D*-глюко-конфигурацией и сама гликозилирована в положение 3 моносахаридом с α -*L*-конфигурацией. В нашем случае 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*L*-ксило-гексоз-4-улоза гликозилирует моносахарид с α -*D*-галакто-конфигурацией в положение 4 и гликозилирована в положение 3 моносахаридом, имеющим α -*D*-глюко-конфигурацию. Другой редкий моносахарид, 2-ацетамидо-4-((3*S*,5*S*)-3,5-дигидроксигексамидо)-2,4-дидезокси-*D*-хиновоза, был идентифицирован ранее в ОПС *F. psychrophilum* (259-93) [45]

Сравнительное изучение поверхностных структур клетки некоторых морских протеобактерий, определяющих их вирулентные и антигенные свойства, будет способствовать определению молекулярных механизмов основных процессов жизни в эволюции микроорганизмов и уточнению существующих уже представлений об организации и функционировании клеточной стенки морских грамотрицательных бактерий. Кроме того, О-антигены морских микроорганизмов являются источником редких и новых моносахаридов, включая высшие сахара и их производные, а их обнаружение вносит существенный вклад в структурную химию микробных полисахаридов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harber H., Schleifer K.H. // The Prokaryotes, Second Ed. / Springer Verlag, Berlin, 1992. V. 2–3. P. 2111–3130.

2. Rietschel E.T., Kinkae N., Shade U.F., Ulmer A.J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Grimmecke H.D., Kusumoto S., Zahringer U. // *Immunobiology*. 1993. V. 187. P. 169–190.
3. Caroff M., Karibian D. // *Carbohydr. Res.* 2003. V. 338. P. 2431–2447.
4. Nazarenko E.L., Komandrova N.A., Gorshkova R.P., Tomshich S.V., Zubkov V.A., Kilcoyne M., Savage A.V. // *Carbohydr. Res.* 2003. V. 338. P. 2449–2457.
5. Командрова Н.А., Назаренко Е.Л., Томищич С.В., Горишкова Р.П. // *Вестник ДВО РАН*. 2004. № 3. С. 54–65.
6. Leone S., Silipo A., Nazarenko E.L., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. // *Mar. Drugs*. 2007. V. 5, № 3. P. 85–112.
7. Nazarenko E.L., Crawford R.J., Ivanova E.P. // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9, No. 10. P. 1914–1954.
8. Petrovskis E.A., Vogel T.M., Adriaens P. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V.121. P. 357–363.
9. Semple K.M., Westlake D.W.S. // *Can. J. Microbiol.* 1987. V. 35. P. 925–931.
10. Meyers C.R., Neelson K.H. // *Science*. 1988. V. 240. P. 1319–1321.
11. Назаренко Е.Л., Перепелов А.В., Шевченко Л.С., Даева Е.Д., Иванова Е.П., Шаилов А.С., Видмалъм Г. // *Биохимия*. 2011. Т. 76, № 7. С. 969–975.
12. Книрель Ю.А., Сенченкова С.Н., Кочарова Н.А., Шаилов А.С., Хелбиг Д.Х., Цэрингер У. // *Биохимия*. 2001. Т. 66, № 9. С. 1271–1279.
13. Nedashkovskaya O.I., Suzuki M., Lysenko A.M., Snauwaert C., Vacanneyt M., Vysotskii M.V., Mikhailov V.V. // *Int. J. Syst. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 604–613.
14. Kang H.Y., Chung B.S., Lee D.H., Jung J.S., Park J.H., Jeon C.O. // *Int. J. Syst. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 654–657.
15. Park S., Oh K.H., Lee S.Y., Oh T.K., Yoon J.H. // *Int. J. Syst. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1354–1358.
16. Томищич С.В., Командрова Н.А., Недашковская О.И., Перепелов А.В., Видмалъм Г., Шаилов А.С. // *Биоорганическая химия*. 2007. Т. 33, № 1. С. 91–95.
17. Perepelov A.V., Shashkov A.S., Tomshich S.V., Komandrova N.A., Nedashkovskaya O.I. // *Carbohydr. Res.* 2007. V. 342. P. 1378–1381.
18. Perepelov A.V., Shashkov A.S., Tomshich S.V., Komandrova N.A., Nedashkovskaya O.I. // *Carbohydr. Res.* 2013. V. 372. P. 69–72.
19. Vinogradov E.V., Knirel Y.A., Thomas-Oates J.E., Shashkov A.S., L'vov V.L. // *Carbohydr. Res.* 1994. V. 258. P. 223–232.
20. Bernardet J.F., Nakagawa Y., Holmes D. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 1049–1070.
21. Ivanova E.P., Nedashkovskaya O.I., Chun J., Lysenko A.M., Frolova G.M., Svetashev V.I., Vysotskii M.V., Mikhailov V.V., Huq A., Colwell R.R. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 1987–1995.
22. Nedashkovskaya O.I., Suzuki M., Vysotskii M.V., Mikhailov V.V. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1287–1290.
23. Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Han S.K., Lysenko A.M., Mikhailov V.V., Bae K.S. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1173–1176.
24. Nedashkovskaya O.I., Vancanneyt M., Cleenwerck I., Snauwaert C., Kim S.B., Lysenko A.M., Shevchenko L.S., Lee K.H., Park M.S., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Bae K.S., Swings J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 155–160.
25. Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lysenko A.M., Lee K.H., Bae K.S., Mikhailov V.V. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 2655–2659.
26. Sun F., Wang B., Du Y., Liu X., Lai Q., Li G., Luo J., Shao Z. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 78–83.
27. Silipo A., Molinaro A., Nazarenko E.L., Sturiale L., Garozzo D., Gorshkova R.P., Nedashkovskaya O.I., Lanzetta R., Parrilli M. // *Carbohydr. Res.* 2005. V. 340. P. 2540–2549.
28. Томищич С.В., Исаков В.В., Командрова Н.А., Шевченко Л.С. // *Биохимия*. 2012. Т. 77, № 1. С. 110–115.
29. Romanenko L.A., Schuman P., Zhukova N. V., Rohde M., Mikhailov V.V., Stackebrandt E. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1885–1888.

30. Park S.J., Kang C.H., Nam Y.D., Bae J.W., Park Y.H., Quan Z.X., Moon D.S., Kim H.J., Roh D.H., Rhee S.K. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 895–898.
31. Srinivas T.N.R., Reddy P., Vishnu V., Begum Z. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1926–1931.
32. Shin N.R., Whon T.W., Roh S.W. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1552–1557.
33. Choi W.C., Kang S.J., Jung Y.T. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2880–2884.
34. Komandrova N.A., Kokoulin M.S., Isakov V.V., Tomshich S.V., Romanenko L.A. // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 347, № 1. P. 178–181.
35. Jung Ji.Y., Kim J.M., Jin H.Mi., Kim S.Y., Park W., Jeon C.O. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 1534–1538.
36. Nedashkovskaya O.I., Kukhlevskiy A.D., Zhukova N.V. // *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2013. V. 103. P. 1263–1269.
37. Gorshkova R.P., Isakov V.V., Shevchenko L.S., Ivanova E.P., Denisenko V.A., Nazarenko E.L. // *Chem. Nat. Comp.* 2007. V. 43. P. 643–647.
38. Ierano T., Silipo A., Nazarenko E.L., Gorshkova R.P., Ivanova E.P., Garozzo D., Sturiale L., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. // *Glycobiology.* 2010. V. 20, No. 5. P. 586–593.
39. Kokoulin M.S., Kalinovskiy A.L., Komandrova N.A., Tovarchi V.E., Tomshich S.V., Nedashkovskaya O.I., Vaskovsky V.E. // *Carbohydr. Res.* 2013. V. 375. P. 105–111.
40. Dale J.A., Mosher H.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1973. V. 95. P. 512–519.
41. MacLean L.L., Perry M.B., Crump E.M., Kay E.V. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 3440–3446.
42. Kilcoyne M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Ivanova E.P., Gorshkova N.M., Senchenkova S.N., Savage A.V. // *Carbohydr. Res.* 2005. V. 15. P. 2369–2375.
43. Sadovskaya I., Brisson J.-R., Altman E., Mutharia L.M. // *Carbohydr. Res.* 1998. V. 253. P. 319–227.
44. Jansson P.-E., Lindberg B., Lindquist U. // *Carbohydr. Res.* 1985. V. 140. P. 101–110.
45. Park S., Kelley K.A., Vinogradov E., Solinga R., Weidenmaier C., Misawa Y., Lee J.C. // *J. Bacteriol.* 2010. P. 4618–4626.

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ ВИРУЛЕНТНОГО ФЕНОТИПА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

С. И. Бахолдина¹, И. Н. Красикова, Т. Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.

Yersinia pseudotuberculosis – возбудитель псевдотуберкулеза, заболевания, актуального для стран с умеренным климатом. Исследовано влияние ряда факторов окружающей среды на структуру и острую токсичность липополисахаридов (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis* и на биологические свойства этих бактерий. Установлено, что культивирование бактерий при низкой температуре на плотных средах при дефиците кислорода и в присутствии галактозы в питательной среде усиливают их рост, повышают адгезивную и инвазивную активности, а также устойчивость к бицидам, антибиотикам и к температурному стрессу. Для *Y. pseudotuberculosis*, выращенных в бульоне с добавлением галактозы, наблюдается увеличение интенсивности размножения бактерий в желудочно-кишечном тракте, а также рост способности клеток преодолевать эпителиальный барьер и проникать во внутреннюю среду организма мышей. Низкая температура и рост в виде колоний способствуют синтезу в *Y. pseudotuberculosis* молекул ЛПС с длинными углеводными цепями и высокой токсичностью, что делает бактерии более устойчивыми к действию защитных факторов макроорганизма и, следовательно, более вирулентными. Совокупность всех экспериментальных данных позволяет предполагать возможность формирования в природе фенотипа *Y. pseudotuberculosis* с высоким инфекционным потенциалом. Полученные результаты представляют интерес для понимания эпидемиологии псевдотуберкулеза, а также для решения практических задач, связанных с разработкой мер профилактики псевдотуберкулезной инфекции.

Ключевые слова: адгезивная и инвазивная активность, чувствительность к антибиотикам и фенолу, липополисахарид, токсичность, вирулентность, *Yersinia pseudotuberculosis*.

The impact of abiotic factors on formation of *Yersinia pseudotuberculosis* virulent phenotype. S. I. Bakholdina¹, I. N. Krasikova, T. F. Solov'eva (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

Yersinia pseudotuberculosis – the causative agent of pseudotuberculosis, a disease that is relevant for countries with temperate climates. The effects of a number of environmental factors on the structure and the acute toxicity of *Y. pseudotuberculosis* lipopolysaccharides (LPS) and biological properties of these bacteria were studied. It was found that the cultivation of the bacteria as colonies on the agar surface at a low temperature, oxygen-deficiency and in the presence of galactose in the growth medium stimulated an intensive bacteria growth, and promoted increasing their adhesive and invasive activities, as well as their resistance to biocides, antibiotics (ampicillin, streptomycin, erythromycin) and temperature stress. As observed, *Y. pseudotuberculosis* bacteria cultivated with addition of galactose in growth medium at low temperature propagated more intensively in the mice digestive tract and demonstrated increasing capability of penetrating epithelial barrier of bowels thus percolating the internal environment. Low cultivation temperature and colonial growth on solid medium stimulated intensive synthesis *Y. pseudotuberculosis* LPS with long O-polysaccharide chains and high toxicity resulting in the enhancement of resistance of bacteria to the action of macroorganism protective factors

¹ Адрес для связи (тел.: +7(924)244-26-93; эл.почта : sibakh@mail.ru).

and hence a rise of their virulence. The experimental facts suggest the possibility of the formation of *Y. pseudotuberculosis* phenotype with high infectious potential in nature. The results obtained are of interest for understanding the epidemiology of pseudotuberculosis, and for solving practical problems related to the development of preventive measures against pseudotuberculosis infection.

Keywords: *adhesive and invasive activity, sensitivity to antibiotics and phenol, heat stress, hypopolysaccharides, toxicity, virulence, Yersinia pseudotuberculosis.*

Yersinia pseudotuberculosis – патогенный вид иерсиний, вызывающий инфекционное заболевание псевдотуберкулез у человека. Интерес к изучению данного вида иерсиний до настоящего времени сохраняется у ученых во всем мире. Это связано с тем, что заболеваемость псевдотуберкулезом (экстраинтестинальный иерсиниоз) распространена во многих странах с умеренным климатом. В России это заболевание в виде спорадических случаев или эпидемических вспышек наиболее часто встречается на Дальнем Востоке, в Сибири, Санкт-Петербурге и Ленинградской области.

Псевдотуберкулез характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и частым развитием осложнений в ходе инфекционного процесса. Еще одной причиной пристального внимания ученых к бактериям псевдотуберкулеза является их фенотипическая и генотипическая близость (около 80% гомологии ДНК) к *Yersinia pestis* – возбудителю чумы.

Биология бактерий псевдотуберкулеза интересна тем, что они обладают двойственной природой – способностью как к паразитированию в организме человека и животных, так и к сапрофитическому существованию вне организма теплокровных хозяев. В силу этой особенности иерсинии имеют высокую адаптационную пластичность, они способны рационально перестраивать свой фенотип в ответ на изменение окружающей среды.

Одним из наиболее важных для эпидемиологии псевдотуберкулеза свойств возбудителя является его психрофильность, т.е. способность расти и размножаться при низких температурах (в том числе от 0 до 4 °C). Культуральные особенности иерсиний позволяют им накапливаться, например, в воде, пищевых продуктах или донорской крови, хранящихся в условиях бытового холодильника. В то же время было установлено, что при росте «на холоду» вирулентность бактерий псевдотуберкулеза может значительно возрастать [1].

В течение ряда лет лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета занимается исследованиями, связанными с формированием в природе потенциально вирулентных фенотипов *Y. pseudotuberculosis*. В рамках этой проблемы проводится изучение влияния условий среды обитания бактерий псевдотуберкулеза на их биологические свойства, а также на структуру и свойства липополисахарида (ЛПС) – основного компонента наружной мембраны бактерий, который играет важную роль в адаптации бактериальной клетки к изменяющейся внешней среде и является фактором патогенности с токсической функцией (эндотоксин).

В природе бактерии псевдотуберкулеза встречаются с большим разнообразием абиотических факторов. Лабораторный эксперимент, включающий искусственное культивирование бактерий, позволяет вычленить отдельные факторы среды и изучить адаптивную реакцию на них микроорганизма. Мы изучили влияние температуры, ре-

жима аэрации и наличия углеводов (глюкоза, галактоза) в ростовой среде на некоторые биологические свойства, которые способствуют выживанию бактерий в условиях макроорганизма и тем самым вносят вклад в формирование вирулентного фенотипа бактерий: адгезивная и инвазивная активность, устойчивость к антибиотикам, хитозану, фенольному биоциду и тепловому шоку при резком повышении температуры от 8 до 37 °С и жизнеспособность в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) экспериментальных животных.

Влияние абиотических факторов на адгезивные и инвазивные свойства *Y. pseudotuberculosis*

Y. pseudotuberculosis относится к энтероинвазивным патогенам, которые после попадания в ЖКТ человека с зараженной пищей быстро проходят через эпителиальный барьер. Адгезивная и инвазивная активности бактерий относятся к группе факторов патогенности с функцией проникновения и распространения, обеспечивающих развитие начальной стадии инфекционного процесса. Способность бактерий к эффективному прикреплению и проникновению в эпителий кишечника человека формируется до поступления их в организм хозяина под влиянием различных факторов окружающей среды.

Мы изучили влияние двух широко распространенных в природе углеводов – глюкозы и галактозы (молочные продукты, овощи, фрукты), а также различных режимов аэрации (интенсивное перемешивание питательной среды и стационарный режим без перемешивания) на адгезивные и инвазивные свойства бактерий псевдотуберкулеза.

Показано, что присутствие галактозы в среде культивирования при низкой температуре увеличивает выход биомассы бактерий псевдотуберкулеза в гораздо большей степени, чем наличие другого углеводного субстрата – глюкозы [2]. Следует отметить, что другие виды иерсиний, за исключением *Y. ruckeri* и *Y. pestis* Pestoides, показали такую же зависимость накопления массы бактерий от наличия в среде галактозы [2]. Для *Escherichia coli* также было отмечено усиление роста под влиянием галактозы. У представителей родов *Salmonella* и *Shigella* размножение бактерий не зависело от присутствия галактозы в среде культивирования.

В опытах *in vitro* показано также, что галактозосодержащая среда в 1.5 раза ($P < 0,05$) увеличивает тканевую инвазивную активность *Y. pseudotuberculosis* в сравнении с глюкозосодержащей средой [3].

Дальнейшее изучение «галактозного» фенотипа было продолжено на мышиной модели *in vivo* с использованием флуоресцентно-меченного штамма *Y. pseudotuberculosis*-GFP. Для этих бактерий наблюдалось увеличение интенсивности размножения в ЖКТ экспериментальных животных и возрастание их способности преодолевать эпителиальный барьер кишечника и проникать во внутреннюю среду организма [2].

Влияние аэрации на биологические свойства бактерий было изучено в экспериментах на культуре клеток *HeLa* [4]. Было установлено, что в условиях дефицита кислорода (стационарный режим культивирования) у бактерий происходит усиление адгезивной и инвазивной активности (в 2 и более раз, в сравнении с бактериями, выращенными при интенсивной аэрации). Добавление глюкозы в питательный бульон

ингибировало инвазивную способность клеток в 2 раза при стационарных условиях роста и в 5 раз – при интенсивном перемешивании питательной среды [4].

Как известно, энтеропатогенные иерсинии обладают множественными факторами, обеспечивающими их проникновение в клетки хозяина. К ним относятся, прежде всего, белки, кодируемые хромосомными *inv* (invasion), *ail* (attachment-invasion locus) и плазмидным *yadA* (*Yersinia* adhesion) генами [5]. Однако в исследуемых вариантах бесплазмидной культуры увеличение инвазивной способности бактерий псевдотуберкулеза под действием галактозы и низкой аэрации среды, вероятно, вызвано накоплением в наружной мембране белка инвазина (продукт гена *inv*), так как он кодируется хромосомным геном, экспрессируется при низкой температуре и является первичным фактором адгезии и инвазии, в отличие от белка Ail, который синтезируется в клетках при 37 °С. Ингибирующее действие глюкозы на гены, контролирующие инвазию, может быть связано как с катаболической репрессией, так и с закислением среды за счет продуктов метаболизма глюкозы [6, 7]. Эффект глюкозы на инвазивные свойства *Y. pseudotuberculosis*, видимо, определяется последней причиной. Ранее мы показали, что культивирование псевдотуберкулезного микроба в присутствии глюкозы приводит к понижению рН среды до 5.0 [8].

Следует отметить, что эти же абиотические сигналы, за исключением низкой температуры, действуют на *Y. pseudotuberculosis* в ЖКТ хозяина. Как известно, анаэробные условия существуют именно в кишечнике, а галактоза входит в состав гликопротеинов и гликолипидов муцинового слоя, который покрывает эпителий ЖКТ. Можно ожидать, что бактерии, которые адаптированы к этим факторам (анаэробные условия, галактоза) в природном окружении, будут более приспособленными к условиям макроорганизма. Это позволит им достичь такой скорости размножения, которая в наибольшей степени будет способствовать использованию ресурсов хозяина при данной стратегии паразитизма, и, следовательно, способствовать развитию болезни.

Влияние абиотических факторов на устойчивость *Y. pseudotuberculosis* к температурному стрессу, антибиотикам и фенолу

Одной из важных проблем микробиологии и медицины, имеющих фундаментальное и прикладное значение, является формирование устойчивости бактерий к антибиотикам и антисептикам под влиянием условий среды обитания. Мы исследовали влияние внешних факторов на чувствительность бактерий псевдотуберкулеза к ампициллину, стрептомицину, эритромицину, полимиксину В, хитозану и его производным, а также к фенольному биоциду.

Было показано, что присутствие галактозы в среде культивирования в условиях высокой аэрации делает бактерии псевдотуберкулеза более устойчивыми, в сравнении с глюкозой, к таким антибиотикам как ампициллин, стрептомицин и эритромицин [3]. Наибольшие различия наблюдались в устойчивости клеток к ампициллину. Так, бактерии, культивируемые на галактозе, были в 8 раз более устойчивы к этому антибиотику, в сравнении с клетками, выращенными на глюкозе. Бактерии, культивируемые без аэрации в присутствии углеводов, характеризовались высокой чувствительностью к антибиотикам. Одной из причин возрастания устойчивости *Y. pseudotuberculosis* к ампициллину под влиянием галактозы и интенсивного перемешивания может быть

снижение проницаемости внешней мембраны микроорганизма для данного антибиотика. Поскольку диффузия бета-лактамовых антибиотиков в клетку происходит через каналы, образуемые порообразующими белками в наружной мембране, возможно, в ампициллин-устойчивом варианте бактерий изменяется содержание и/или тип поринов. Ранее было показано, что состав среды действительно может влиять на экспрессию разных классов белков-поринов [9]. При 37 °C устойчивость клеток к полимиксину В возрастает независимо от состава питательной среды, а при 8 °C – на средах с рамнозой, галактозой, ксилозой, маннозой, трегалозой или мальтозой.

Нами была изучена антимикробная активность хитозана и его водорастворимых производных в отношении бактерий псевдотуберкулеза [10]. Чувствительность бактерий псевдотуберкулеза к хитозанам зависит от условий культивирования. Так, добавление галактозы в среду роста увеличивает устойчивость *Y. pseudotuberculosis* к дестабилизирующему действию хитозана и его производных на клеточные оболочки этих бактерий, вероятно, за счет изменений в фосфолипидном и ЛПС составе [10].

Антисептики и дезинфектанты широко применяются для борьбы с бактериальным загрязнением. Одним из биоцидов, используемых в течение длительного времени и до сих пор не потерявших своего значения, является фенол. Была исследована регуляция устойчивости бактерий псевдотуберкулеза к фенолу факторами внешней среды [11]. Установлено, что выживаемость бактерий существенно зависит не только от концентрации фенола, времени обработки биоцидом, но и от условий культивирования клеток [11]. Добавление в питательную среду углеводов (глюкозы или галактозы) увеличивает устойчивость иерсиний к фенолу. При этом эффект от наличия в среде галактозы выше, чем от присутствия глюкозы. Следует отметить, что культура бактерий псевдотуберкулеза гетерогенна по устойчивости к фенолу, и эта неоднородность популяции сохраняется независимо от условий культивирования [11].

Бактерии *Y. pseudotuberculosis* в ответ на фенол-индуцированный стресс перестраивают наружную мембрану путем модификации фосфолипидного и жирнокислотного состава клеток, что приводит к более плотной упаковке липидного бислоя и большей его стабилизации [11]. В этом процессе вероятно принимает активное участие фосфолипаза А, о чем свидетельствует накопление в клетке лизофосфатидилэтаноламина с параллельным уменьшением содержания фосфатидилэтаноламина и высвобождение в культуральную среду ЛПС [11].

С целью дальнейшего изучения защитной функции фосфолипазы при действии внешних токсических факторов были получены мутантные штаммы *Y. pseudotuberculosis* с гипо- и гиперэкспрессией фермента и изучено влияние его содержания в наружной мембране на ответ бактерий на обработку их фенолом [12]. Было показано, что 50%-ная разрушающая доза фенола для клеток с гиперэкспрессией в 2 раза выше, чем для клеток с гипоекспрессией фосфолипазы А. Выявлена также корреляция между уровнем экспрессии этого фермента в клетках *Y. pseudotuberculosis* и уровнем секретируемого в культуральную среду эндотоксина (ЛПС) [12]. Таким образом, фосфолипаза А принимает участие в защите грамотрицательных бактерий от действия токсических факторов.

При переходе из окружающей среды внутрь теплокровного организма бактерии испытывают температурный стресс, вызванный резким повышением температуры, который может отрицательно влиять на их жизнеспособность. Мы установили, что

выращивание бактерий в условиях дефицита кислорода повышает устойчивость клеток к температурному сдвигу от 8 до 37 °C [4]. Это, вероятно, будет способствовать выживанию иерсиний в организме теплокровного хозяина. Было показано также, что в микроаэробных условиях роста при низкой температуре у бактерий псевдотуберкулеза повышается плотность упаковки липидного матрикса мембран, чем, вероятно, объясняется их устойчивость к температурному шоку [8].

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что галактоза в качестве субстрата, дефицит кислорода и низкая температура роста способствуют увеличению вирулентности бактерий псевдотуберкулеза за счет повышения интенсивности их размножения и способности к адгезии и инвазии, увеличения устойчивости к тепловому шоку, антибиотикам, хитозану и фенольному биоциду.

Влияние условий роста на структуру и острую токсичность липополисахаридов *Y. pseudotuberculosis*

Изменения во внешнем окружении клетки сопровождаются модификацией структуры и биологических свойств ЛПС, что, в свою очередь, приводит к изменению физико-химических и биологических свойств клетки и ее патогенного потенциала.

Амфифильная молекула ЛПС в S-форме (S-ЛПС), характерная для большинства встречающихся в природе диких штаммов бактерий, образующих колонии гладкой формы, состоит из трех частей: липида А, олигосахарида кора и O-полисахаридной цепи (O-цепь) [13]. Микроорганизмы, дающие колонии шероховатой формы, продуцируют ЛПС в R-форме (R-ЛПС) с короткими O-цепями или полным их отсутствием.

Липид А энтеробактерий представляет собой дисахарид, замещенный по гидроксильным и аминокетильным остаткам длинноцепочечных жирных кислот (ЖК), среди которых основной является 3-гидроксиалкановая кислота [13]. Эта жирная кислота в свою очередь может быть замещена по оксигруппе другой жирной кислотой, степень ее ацилирования (СА) может варьировать от 25 до 50%. Общее число остатков ЖК липида А обычно колеблется от пяти до семи. Молекула ЛПС закреплена в наружной мембране ее липидным фрагментом, O-цепь ориентирована в сторону окружающей среды.

O-Полисахаридный фрагмент молекулы ЛПС отвечает за устойчивость бактерий к факторам защиты хозяина и в большой степени определяет адгезивные свойства ЛПС. Липополисахариды с длинными O-цепями обладают большей адгезивностью, чем ЛПС с короткими O-цепями [14]. Липид А обуславливает токсические свойства ЛПС, которые зависят от его структуры. Максимальная токсичность наблюдается у ЛПС, липид А которых имеет гексаацильный тип структуры (общее количество остатков ЖК – 6, степень ацилирования остатков 3-оксиалкановой кислоты близка к 50%) [13].

Мы исследовали влияние температуры (8 и 37° C, «холодовой» и «тепловой» варианты бактерий), способа культивирования (суспензионная культура и колонияльная культура) и фазы роста клеток на структуру и острую токсичность ЛПС, что позволило оценить вклад ЛПС в патогенный потенциал бактерий, растущих на холоду.

Температура. Нами было показано, что бактерии псевдотуберкулеза при «холодовом» варианте дольше сохраняют жизнеспособность и дают более высокие выходы биомассы как на жидких, так и на плотных питательных средах [15, 16]. Это сви-

детельствует о том, что для роста *Y. pseudotuberculosis* низкая температура является более благоприятной, чем 37 °С.

Липополисахариды «тепловых» и «холодовых» вариантов бактерий псевдотуберкулеза содержали только насыщенные жирные кислоты [17]. Это отличает *Y. pseudotuberculosis* от других энтеробактерий, которые на холоду синтезируют ЛПС с ненасыщенными, а при 37 °С – с насыщенными ЖК [18]. Действие температурного фактора на состав жирных кислот ЛПС псевдотуберкулезного микроба проявлялось в изменении степени ацилирования остатков 3-гидрокситетрадекановой кислоты, которая достигала максимума у «холодовых» вариантов [17]. Это дает основание полагать, что в ЛПС псевдотуберкулезного микроба функции мононенасыщенных ЖК выполняют 3-ацилоксиалкановые кислоты. Они препятствуют плотной упаковке углеводородных цепей, способствуют уменьшению температуры фазовых переходов ЛПС, тем самым обеспечивают жидкокристаллическое состояние мембраны, необходимое для нормального функционирования клетки при низкой температуре.

Температура культивирования оказывала также существенное влияние на размер *O*-полисахаридной цепи ЛПС *Y. pseudotuberculosis* [15, 19]. ЛПС «теплого» варианта бактерий имели короткие *O*-полисахаридные цепи. Понижение температуры культивирования псевдотуберкулезного микроба приводило к повышению синтеза ЛПС с длинными *O*-цепями. Таким образом, ЛПС «холодовых» вариантов бактерий могут выступать как эффективный фактор адгезии [14]. Интересно отметить, что у иерсиний наблюдается корреляция между длиной *O*-цепи ЛПС и уровнем экспрессии инвазина. Так, было показано, что в *R*-мутантах *Y. enterocolitica*, синтезирующих ЛПС без *O*-цепи, происходит снижение уровня экспрессии инвазина [20]. Следовательно, низкая температура роста стимулирует синтез факторов вирулентности с функцией адгезии и инвазии: ЛПС с длинными *O*-цепями, инвазина, тем самым повышая патогенный потенциал бактерий псевдотуберкулеза.

Следует отметить, что подобную зависимость размера специфической углеводной цепи от температуры роста бактерий наблюдали и для ЛПС *Y. enterocolitica* [21]. В то же время, для ЛПС других кишечных патогенов, типичных мезофилов (*Salmonella* и др.), отмечена обратная зависимость: длина *O*-полисахаридных фрагментов ЛПС возрастала с повышением температуры культивирования бактерий [22]. Возможно, различие в регуляции структуры ЛПС в ответ на изменение температуры между иерсиниями и другими энтеробактериями определяется разной стратегией их выживания в условиях макроорганизма. Известно, например, что прекращение экспрессии *O*-полисахаридных цепей ЛПС в иерсиниях при 37 °С (температуре тела человека при инфекционном процессе) необходимо для увеличения доступности других факторов вирулентности (поверхностных белков), которые синтезируются в этих условиях.

Способ культивирования. Установлено, что способ культивирования бактерий псевдотуберкулеза также оказывал влияние на структуру ЛПС [23]. Когда клетки росли на плотной среде (колониальная культура), в них происходил более интенсивный синтез молекул ЛПС, которые имели в среднем более длинные *O*-полисахаридные цепи, в сравнении с ЛПС бактерий, растущих в жидкой среде (суспензионная культура). При обоих способах культивирования содержание ЛПС зависело от фазы роста бактерий, но динамика изменения их содержания по мере старения клеток в колониальных и суспензионных культурах была различна: степень ацилирования ЛПС оста-

валась величиной постоянной, в то время как длина *O*-цепи варьировала и у обеих культур достигала максимального значения в стационарной фазе роста [23].

Острая токсичность ЛПС различной структуры. Было исследовано влияние структуры ЛПС (длина *O*-цепи, степень ацилирования остатков 3-гидрокситетрадекановой кислоты) на их токсическую активность. С этой целью была определена 50%-ная летальная доза (LD_{50}) для мышей ЛПС разной структуры, полученных из бактерий псевдотуберкулеза, выращенных при различных условиях [23, 24]. Установлено, что токсичность ЛПС прямо пропорциональна их степени ацилирования и длине углеводной цепи. Максимальной токсичностью обладал ЛПС, имеющий гексаацильный тип липида А и самую длинную углеводную цепь (СП=16), который был выделен из «холодового» варианта колониальной культуры. SR-ЛПС с пентаацильным типом липида А из «теплого» варианта суспензионной культуры *Y. pseudotuberculosis* был в 28 раз менее токсичным.

Таким образом, низкая температура и рост *Y. pseudotuberculosis* в виде колоний способствуют синтезу более токсичных молекул ЛПС с длинными *O*-цепями, что, вероятно, делает бактерии более устойчивыми к действию защитных факторов макроорганизма и, следовательно, более вирулентными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенный потенциал бактерий псевдотуберкулеза при низкой температуре роста усиливается под влиянием таких факторов окружающей среды, как присутствие галактозы в питательной среде и недостаток кислорода. Имеет значение и способ культивирования бактерий, а именно рост в виде колоний на плотных средах, поскольку ЛПС, выделенные из колониальной культуры, характеризуются более высокими значениями СП *O*-специфического полисахарида и обладают более высокой острой токсичностью. При вышеназванных условиях в природе может сформироваться фенотип *Y. pseudotuberculosis* с высоким инфекционным потенциалом.

Проведенные исследования показывают, что степень устойчивости бактерий псевдотуберкулеза к ряду антибиотиков и к фенолу не является их постоянной характеристикой, она может усиливаться под действием внешних факторов, таких как температура и присутствие углеводов в среде роста. В составе бактериальной культуры могут находиться разные по устойчивости к антибиотикам и фенолу клетки, что необходимо учитывать при выборе концентраций биоцида для проведения дезинфекционных мероприятий, чтобы избежать появления биоцид- и антибиотикоустойчивых штаммов. Результаты, полученные в ходе исследований, представляют интерес для понимания эпидемиологии и инфекционной патологии псевдотуберкулеза, а также для решения практических задач, связанных с разработкой мер профилактики инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. / М.: Медицина, 2001. 256 с.

2. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Исаева М.П., Ракин А.В., Соловьева Т.Ф. // Тихоокеанский мед. журн. 2010. № 4. С.16–19.
3. Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф., Шубин Ф.Н., Тимченко Н.Ф. // Журн. микробиол. 2005. № 5. С. 6–10.
4. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Соловьева Т.Ф. // Журн. микробиол. 2009. № 3. С. 18–23.
5. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. // Клин. микробиол. и антимикробн. химиотерапия. 2002. № 3. С. 248–266.
6. Jaradat Z.W., Bhunia A.K. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4876–4883.
7. Yohannes E., Barnhart D.M., Slonczewski J.L. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 192–199.
8. Бахолдина С.И., Санина Н.М., Шубин Ф.Н., Попова О.Б., Соловьева Т.Ф. // Микробиология. 2007. Т. 76, № 3. С. 321–328.
9. Liu X., Ferenci T. // J. Bacteriol. 1998. V. 180, No. 15. P. 3917–3922.
10. Набережных Г.А., Бахолдина С.И., Горбач В.И., Соловьева Т.Ф. // Биология моря. 2009. Т. 35, №6. С. 444–449.
11. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Санина Н.М., Соловьева Т.Ф. // Журн. микробиол. 2011. № 6. С. 64–69.
12. Bakholdina S.I., Tischenko N.M., Isaeva M.P., Portnyagina O.Yu., Davidova V.N., Solov'eva T.F. // 2 nd International Symposium on Life Sciences. 2013. Vladivostok. P. 54.
13. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. 1993. Т. 58, № 2. С. 166–181.
14. Francki K.T., Chang B.J. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 122, No. 1-2. P. 97– 101.
15. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2001. Т. 66, № 8. С. 1122–1127.
16. Бахолдина С.И., Красикова И.Н., Шубин Ф.Н., Бузолева Л.С., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2001. Т. 66, № 4. С. 511–519.
17. Красикова И.Н., Бахолдина С.И., Хотимченко С.В., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 1999. Т. 64, № 3. С. 338–344.
18. Rottem S., Markowitz O., Rasin S. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 85, No. 2. P. 445–450.
19. Соловьева Т.Ф., Ермак И.М., Мороз (Бахолдина) С.И., Красикова И.Н., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Фролова Г.М., Иванова Е.П., Тимченко Н.Ф., Оводов Ю.С. // Биол. мембраны. 1988. Т. 5, № 5. С. 492–500.
20. Llompart C.M., Perez-Gutierrez C., Bengoechea J.A. // 9th Intern. Symp. on Yersinia. Lexington, Kentucky, USA. 2006. P. 47–48.
21. Al-Hendy A., Toivanen P., Skurnik M. // Microb. Pathog. 1991. V. 10, No. 1. P. 81–86.
22. Schlecht S., Mayer H. // Zbl. Bakt. 1994. V. 280, No. 4. P. 448–457.
23. Бахолдина С.И., Красикова И.Н., Соловьева Т.Ф. // Биоорг. химия. 2001. Т. 27, № 2. С. 151–155.
24. Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф. // Вестник ДВО РАН. 2009. №3. С. 85–90.

НОВЫЙ КЛАСС ЛЕКТИНОВ ИЗ МИДИЙ СЕМЕЙСТВА MYTILIDAE

О. В. Черников¹, И. В. Чикаловец, В. И. Молчанова,
С. Н. Ковальчук, П. А. Лукьянов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.

В статье приведены результаты исследований, касающиеся выделения, определения основных физико-химических свойств и углеводной специфичности лектинов из двусторчатых моллюсков семейства Mytilidae. Показано, что выделенные нами лектины из мидий *Crenomytilus grayanus* (CGL) и *Mytilus trossulus* (MTL), а также известный лектин из мидии *Mytilus galloprovincialis* являются представителями нового класса лектинов. Приведен сравнительный анализ цитокин-стимулирующей активности лектинов CGL и MTL.

Ключевые слова: лектины, морские беспозвоночные, биологическая активность, первичная структура, углевод-белковое взаимодействие.

New class of lectins from the mussels of Mytilidae family. O. V. Chernikov¹, I. V. Chikalovets, V. I. Molchanova, S. N. Kovalchuk, P. A. Lukyanov (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The results of investigations on isolation, main physico-chemical properties and carbohydrate specificity of lectins from bivalves of the Mytilidae family are described. The newly isolated lectin from the *Mytilus trossulus* mussel is shown to be probably another member of a new class of lectins together with lectins from the mussels *Crenomytilus grayanus* (CGL) and *Mytilus galloprovincialis* (MTL). The comparative analysis of cytokine-stimulating activity of the CGL and MTL is provided.

Keywords: lectins, biological activity.

Лектины – это белки или гликопротеины, специфически и обратимо связывающие моно-, олигосахариды и гликоконъюгаты, не вызывая их химического превращения. Входя в структуру тканей животных, растений, микроорганизмов, они принимают участие как в регулировании их метаболизма, так и в защите от некоторых агентов внешней среды. С другой стороны, лектины, выделенные из живых объектов, являются ценными биохимическими реагентами, использование которых получает свое развитие в экспериментальной цитологии, диагностике некоторых заболеваний и, наконец, в биотехнологических процессах выделения некоторых сложных углеводсодержащих веществ. В последние годы делаются попытки использования лектинов и в качестве лекарственных препаратов.

¹ Автор для связи (+7 (423) 231-07-19; эл. почта: chernikov@piboc.dvo.ru).

Сокращения: ТЛФА – твердофазный лектин-ферментный анализ; CGL – лектин из мидии *Crenomytilus grayanus*; MTL – лектин из мидии *Mytilus trossulus*.

На сегодняшний день лектины обнаружены во всех биологических таксонах [1]. Морские беспозвоночные относятся к сравнительно новым источникам лектинов. В эволюционном плане лектины беспозвоночных являются предшественниками антител млекопитающих и формируют примитивную иммунную систему. Кроме того, они обладают антибактериальной, цитотоксической, противоопухолевой, митогенной, анти-ВИЧ активностями [2-6].

Коллектив лаборатории химии неинфекционного иммунитета на протяжении многих лет проводит исследования по выделению, установлению структуры, изучению физико-химических свойств и биологической активности лектинов из морских беспозвоночных и водорослей [7-11]. Нами разработаны методы твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА), которые позволяют изучать углеводный профиль гликопротеинов плазмы крови и других биологических жидкостей человека, получены результаты по использованию разработанных тест-систем для диагностики онкопатологий [12]. В последнее время наибольшее внимание было уделено поиску источников лектинов среди наиболее распространенных промысловых видов мидий семейства Mytilidae, которые имеют обширный ареал распространения и являются одним из важнейших объектов маркикультуры.

Из мидии *Crenomytilus grayanus* нами был выделен металлонеинформационный Gal/GalNAc-специфичный лектин (CGL), определены его основные физико-химические свойства и углеводная специфичность (табл. 1) [13]. Показано, что CGL, меченный пероксидазой, является прекрасным гистохимическим маркером, который позволяет маркировать клетки определенного типа, следить за гликоконъюгат-зависимыми процессами, протекающими в нормальных тканях и опухолях с участием гликопротеинов муцинового типа [14]. CGL обладает антибактериальной активностью, связываясь как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями. Мы полагаем, что CGL принимает участие в неспецифических иммунных защитных реакциях в организме мидии, узнавая и удаляя бактериальные патогены [15].

Таблица 1. Физико-химические характеристики CGL и MTL

Характеристики	CGL	MTL
Молекулярная масса	16953 Да	16492 Да
Углеводная специфичность	Gal/GalNAc	Gal/GalNAc
Изоэлектрическая точка	6.12±0.09	6.09±0.01
Содержание аминокислот (АК)	Незаряженные АК – 61.55 % Кислые АК – 20.40 % Основные АК – 18.05	Незаряженные АК – 62.66 % Кислые АК – 26.90 % Основные АК – 10.44 %
pH оптимум	8.0-10.0	9.0-10.0
Металлозависимость	нет	нет
Термостабильность	65 °С	60 °С
Гемагглютинирующая активность	трипсинизированные эритроциты человека группы 0	трипсинизированные эритроциты человека группы А

Для определения аминокислотной последовательности CGL были подобраны условия ферментативного гидролиза полипептидной цепи, поскольку N-концевая аминокислота CGL оказалась заблокирована. Для некоторых пептидов, полученных из

этого лектина, методом секвенирования по Эдману установлена аминокислотная последовательность. Так, триптическим гидролизом было получено 6 пептидов: YIHPK, LVLPGYGIQANP, MYFQFDVVDE, FLYPYG, GVQANPINET, FLVPYGIS; при гидролизе эндопротеиназой Lys-C – 2 пептида: LVLHSDIHERMYFQFDVVDERLFIYPVAS и YIHPK. На основе установленных последовательностей пептидов были синтезированы 15 праймеров.

Используя тактику молекулярного клонирования была получена полноразмерная последовательность кДНК длиной 750 п.н., которая содержит открытую рамку считывания 450 п.н., кодирующую полипептид, состоящий из 150 аминокислотных остатков (рис. 1). Расчетная молекулярная масса (17025 Да) хорошо согласуется с данными масс-спектрометрии (16953 Да), если предположить, что в результате посттрансляционных модификаций происходит отщепление N-концевого остатка метионина и последующее ацетилирование треонина.

```
tattatagttggaagaggcatcatatctaacaatcggaacacaaaatatcttaaacgtgaaac
agtatagcaaaaatgacaacgtttcttatcaaacacaagccagtggaagtttcttcat
      M T T F L I K H K A S G K F L H 16
ccatacgggtggcagtagcaaccctgctaacaataactaagttggtcctgcatagcgatatac
P Y G G S S N P A N N T K L V L H S D I 36
catgaaagaatgtacttccagtttgatgttggtgatgaacgatggggatatataaaacat
H E R M Y F Q F D V V D E R W G Y I K H 56
gttgcaagtggaaaaattgtccatccctacggcggacaagctaatccaccaaatgaaacc
V A S G K I V H P Y G G Q A N P P N E T 76
aatatggttctgcatcaagatcgatcatgacgggcactattcgccatggatttcttcaac
N M V L H Q D R H D R A L F A M D F F N 96
gacaatattatgcacaaaggcggtaaatacatccacccaaggcgatccccgaatcca
D N I M H K G G K Y I H P K G G S P N P 116
ccgaataataaccgaaacagttatacatggagataaacatgcagccatggaattcattttt
P N N T E T V I H G D K H A A M E F I F 136
gtttcgccaaaaataaagacaagcgcttttagtttatgcctaaagtttatgatttaaa
V S P K N K D K R V L V Y A 150
tgaacaaaacagattttatatctagcttgcttaaacgttagcttgctataactttttttat
ctaaataaacaagaaggattttgacattgcaaaaattttggaacacatgaacaacaagga
tttagacattgctcgcttaattgtttattcttcatatataataataaatgcacatttaga
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность кДНК и аминокислотная последовательность CGL.

Подчеркнуты последовательности пептидов, установленные методом Эдмана и ESI-MS/MS.

Серым цветом отмечены потенциальные сайты гликозилирования

Поиск по базе данных NCBI Conserved Domains не выявил в аминокислотной последовательности лектина консервативных доменов. Аналогичные результаты были получены с использованием сервера SMART, однако анализ показал, что CGL содержит в цепи 3 внутренних повтора с гомологией до 73%. Расчеты, полученные программой PSIPRED, дают следующее содержание канонических структур: 38.7% β -структуры, 6% α -спиралей и 55.3% неупорядоченной формы. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее методом КД-спектроскопии. Таким образом, характерным признаком структурной организации CGL является преоблада-

ние β -структуры. Предсказание третичной структуры с помощью программ PHYRE2 и FUGUE показало, что CGL имеет тип укладки, называемый « β -трилистник». Он характерен для В-цепи рибина и еще для тринадцати белковых семейств, таких как цитокины, агглютинины и др.

Поиск гомологов по известным базам данных показал, что полученная нами полипептидная последовательность CGL не имеет структурной гомологии с представителями известных классов лектинов. В то же время первичная структура CGL на 89% совпадала со структурой недавно выделенного Gal/GalNAc-специфичного неклассифицированного лектина из мидии *Mytilus galloprovincialis* (MytiLec) [16]. Высокая степень гомологии между этими лектинами, а также тот факт, что оба лектина выделены из представителей одного семейства Mytilidae, свидетельствуют о том, что CGL и MytiLec образуют совершенно новый класс Gal-специфичных лектинов.

В экстракте мантии мидии *Mytilus trossulus*, еще одного представителя сем. Mytilidae, нами были выявлены белки, проявляющие гемагглютинирующую активность и обладающие перекрестной реактивностью с CGL [17]. Обнаружение белков, потенциальных членов только этого нового класса лектинов, представляет несомненный интерес. Поэтому нами была разработана схема выделения и очистки лектина из мантии мидии *M. trossulus*, названного MTL, включающая аффинную и гельпроникающую хроматографию, в результате которой был получен гомогенный белок с молекулярной массой 16492 Да.

Наибольшую гемагглютинирующую активность лектин проявляет в реакции с трипсинозированными эритроцитами человека группы А, лучшими ингибиторами являются Gal и GalNAc (табл. 1). Изоэлектрическая точка MTL по результатам капиллярного электрофореза составляет 6.09 ± 0.01 . Это согласуется с данными по аминокислотному составу лектина, который содержит большое количество неполярных аминокислот и отрицательно заряженных аминокислот и небольшое – положительно заряженных аминокислот. MTL является термостабильным металлонеинdependent белком с оптимумом pH 9.0-10.0 [18]. Таким образом, по своим основным физико-химическим характеристикам и углеводной специфичности MTL оказался близок к CGL.

С помощью разработанного нами метода иммуноферментного анализа на основе иммуноглобулинов, полученных против CGL, была определена степень перекрестной реактивности между CGL и MTL, которая составила около 50%. Трипсинолиз MTL в геле и анализ восьми полученных пептидов методом масс-спектрометрии (рис. 2) показали, что три из них имели молекулярную массу, идентичную пептидам, полученным при трипсинолизе CGL. Окончательный вывод о степени гомологии между этими лектинами можно будет сделать только после сравнения их аминокислотных последовательностей. Однако уже сейчас можно сделать предположение, что CGL, MTL и MytiLec формируют новое семейство лектинов.

В последние годы внимание ученых сосредоточено на регуляторных белках, секретируемых клетками организма человека. Широко обсуждается их роль в регуляции клеток иммунной системы и модуляции воспалительной реакции. Известно, что в очагах воспаления присутствует большое количество цитокинов. Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма, осуществляя взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом. Важность и

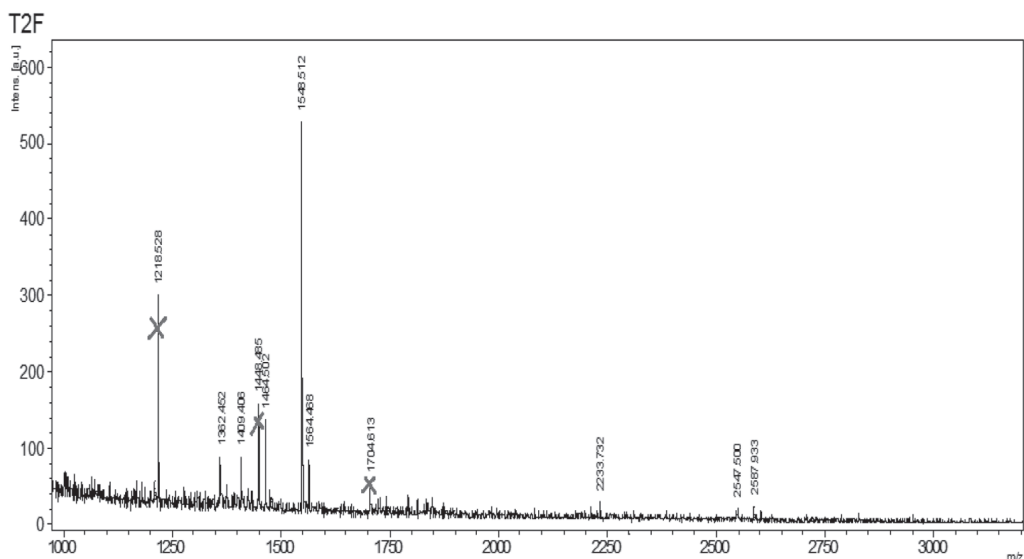


Рис. 2. Масс-спектр смеси пептидов после обработки MTL трипсином. Крестиками отмечены пептиды MTL, совпадающие по молекулярной массе с пептидами CGL

перспективность изучения цитокинов заключается в их значительной роли в пато- и иммуногенезе. Изменение продукции цитокинов в организме имеет огромное клиническое значение, оказывая либо протективное, либо патогенное действие. Сверхэкспрессия этих белков вызывает превращение локального воспаления в генерализованный сепсис и тяжелую полиорганную недостаточность [19].

Известно, что бактериальные липополисахариды, полигликаны, другие цитокины, регуляторные пептиды и множество иных разнообразных субстанций могут влиять на продукцию цитокинов [20]. В настоящее время в литературе отсутствуют данные о влиянии лектинов морских беспозвоночных на индукцию цитокинов. Нами было исследовано влияние CGL и MTL на спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных ($\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$) цитокинов клетками периферической крови человека. Для индукции синтеза цитокинов использовали липополисахарид клеточной стенки *Escherichia coli* O:55.

Оба лектина оказывали стимулирующее действие на спонтанную и индуцированную продукцию $\text{TNF-}\alpha$ (табл. 2). Добавление CGL в концентрации 5 мкг/мл приводило к некоторому уменьшению продукции $\text{TNF-}\alpha$. MTL стимулировал спонтанную и индуцированную продукцию $\text{INF-}\gamma$ только при концентрации 100 мкг/мл, в то время как CGL повышал синтез этого цитокина во всех концентрациях. Влияние лектинов на продукцию провоспалительных цитокинов свидетельствует об их иммуностимулирующей активности.

В литературе встречаются данные об участии цитокин-подобных молекул в защитных реакциях моллюсков и о способности различных цитокинов млекопитающих ($\text{IL-1}\alpha$, IL-2 и $\text{TNF-}\alpha$) стимулировать подвижность гемоцитов моллюсков, активизировать фагоцитарную активность и индуцировать NO-синтазу [21]. Полученные данные позволяют предположить, что CGL и MTL стимулируют продукцию аналогов

Таблица 2. Влияние CGL и MTL на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов

	Концентрация лектинов мкг/мл	Концентрация цитокина, пкг/мл $\pm$ SD			
		INF- γ		TNF- α	
		Спонтанная	Индуцированная	Спонтанная	Индуцированная
CGL	0	3.46 $\pm$ 0.36	190.02 $\pm$ 45.10	419.14 $\pm$ 3.59	1245.23 $\pm$ 66.64
	5	27.05 $\pm$ 3.80	275.41 $\pm$ 5.75	599.19 $\pm$ 32.21	1131.68 $\pm$ 43.56
	100	869.46 $\pm$ 21.28	1182.85 $\pm$ 28.96	1840.76 $\pm$ 40.19	1599.39 $\pm$ 42.36
MTL	0	60.3 $\pm$ 2.8	66.2 $\pm$ 6.9	260.8 $\pm$ 63.8	573.9 $\pm$ 11.9
	5	61.3 $\pm$ 1.4	72.3 $\pm$ 6.4	518.7 $\pm$ 149.2	723.6 $\pm$ 28.3
	100	163.2 $\pm$ 27.7	222.3 $\pm$ 27.5	1015.9 $\pm$ 50.8	925.4 $\pm$ 39.2

цитокинов в организме моллюска. Кроме того, в разных физиологических и патологических условиях лектины могут оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее действие для поддержания иммунного клеточного гомеостаза и регулирования вос-
паления.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-00862), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта ДВО РАН 12-III-A-05-067.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharon N., Lis H. // *Lectins* / Netherlands: Springer, 2007. 470 p.
2. Hatakeyama T., Suenaga T., Eto S., Niidome T., Aoyagi H. // *J. Biochem.* 2004. V. 135. P. 65-70.
3. Kuramoto T., Uzuyma H., Hatakeyama T., Tamura T., Nakashima T., Yamaguchi K., Oda T. // *J. Biochem.* 2005. V. 137. P. 41-50.
4. Opric M., Poznanovic S., Kljajic Z., Sladic D., Pupic G., Perunovic B., Gasic M.J. // *Eur. J. Histochem.* 1996. V. 40. P. 211-218.
5. Pajic I., Kljajic Z., Dogovic N., Sladic D., Juranic Z., Gasic M.J. // *Comp. Biochem. Physiol.* 2002. V. 132. P. 213-221.
6. Wang J.H., Kong J., Li W., Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Belogortseva N.I., Lukyanov P.A., Zheng Y.T. // *Comp. Biochem. Physiol.* 2006. V. 142. P. 111-117.
7. Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Belogortseva N.I., Li W., Wang J-H., Yang D-Y., Zheng Y-T., Lukyanov P.I. // *Comp. Biochem. Physiol. C.* 2007. V. 145, No. 2. P. 184-193.
8. Лукьянов П.А., Черников О.В., Кобелев С.С., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Ли В. // *Био-
орган. химия.* 2007. Т. 33, № 1. С. 172-181.
9. Черников О.В., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Павлова М.А., Лукьянов П.А. // *Биология
моря.* 2007. Т. 33, № 5. С. 379-381.
10. Molchanova V.I., Chernikov O.V., Chikalovets I.V., Lukyanov P.A. // *Bot. Marina.* 2010. V. 53. P. 69-78.
11. Tong C., Li W., Jin Q., Tan C., Qu M., Chen W., Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Lukyanov P.A. // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. V. 10, No. 80. P. 18532-18538.

12. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Булгаков А.А., Черников О.В., Петрова И.Ю., Лукьянов П.А. // Вестник ДВО РАН. 2010. № 5. С. 125-130.
13. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.A., Skobun A.C., Glazkova V.E. // Comp. Biochem. Physiol. 1998. V. 119. P. 45-50.
14. Фуртак В.А., Курикова А.В., Белогорцева Н.И., Чикаловец И.В., Клещенко Ю.Е. // Бюлл. экпер. биол. мед. 1999. Т. 128, № 10. С. 441-444.
15. Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A., Lukyanov P.A. // Fish Shellfish Immunol. 2013. V. 35. P. 1320-1324.
16. Fujii Y., Dohmae N., Takio K., Kawsar S.M., Matsumoto R., Hasan I., Koide Y., Kanaly R.A., Yasumitsu H., Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Nitta K., Hamako J., Matsui T. Ozeki Y. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 44772-44783.
17. Чикаловец И.В., Черников О.В., Шехова Е.А., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. // Биология моря. 2010. Т. 36. С. 70-74.
18. Чикаловец И.В., Кондрашина А.С., Черников О.В., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. // Химия природ. соедин. 2012, № 6. С. 933-936.
19. Кулинский В.И. // Биохимия. 2007. Т. 72, Вып. 6. С. 733-746.
20. Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н., Молчанова В.И., Беседнова Н.Н., Энштейн Л.М. // Мед. иммунология. 2004. Т. 6, № 1-2. С. 89-96.
21. Ottaviana E., Franchinia A., Cassanellia S., Genedanib S. // Biol. Cell. 1995. V. 85. P. 87-91.

ПОЛИСАХАРИДЫ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ФЕРМЕНТЫ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ ИХ ПРЕВРАЩЕНИЯ. ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ БАД И ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ТРАНСФОРМАЦИИ

Т. Н. Звягинцева¹, М. И. Кусайкин, С. П. Ермакова, Н. М. Шевченко

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 159*

В обзорной статье приведены краткие сведения о составе, содержании, структуре и биологической активности полисахаридов из дальневосточных видов бурых водорослей, распространении и свойствах ферментов из морских организмов, катализирующих их трансформацию, и созданных на основе фукоидана из *Fucus evanescens* БАД серии «Фуколам®».

Ключевые слова: *бурые водоросли, морские моллюски и бактерии, альгиновая кислота, альгинат-лиазы, фукоидан, фукоиданазы, ламинаран, ламинариназы, БАД.*

Polysaccharides of brown algae and marine organisms enzymes, which catalyze their transformation. Prospects of creation of the supplements and drugs based on polysaccharides and products of their transformation. *T.N. Zvyagintseva¹ S.P. Ermakova, M.I. Kusaykin, N.M. Shevchenko* (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The review gives the brief information on the composition, content, structure and biological activity of polysaccharides from the Far Eastern species of brown algae, about the distribution and properties of the marine organisms' enzymes that catalyze their transformation. It also provides information about the supplements of series «Fucolam®» created on the basis of fucoidan from *Fucus evanescens*.

Keywords: *brown algae, marine molluscs and bacteria, alginic acid, alginate lyases, fucoidan, fucoidanases, laminaran, laminarinases, supplements.*

ВВЕДЕНИЕ

Водоросли, древнейшие фотосинтезирующие организмы, составляют в царстве растений многочисленную группу, содержащую более 30 000 видов. За миллионы лет существования нашей планеты водоросли-макрофиты приобрели совершенные морфологические и физиологические формы и приспособились к изменяющимся условиям среды. Это привело к их широкому распространению и формированию разноплановых биотических взаимоотношений с другими видами. Водоросли обладают комплексом уникальных целебных свойств, которые отсутствуют у растений, произрастающих на суше.

¹ Автор для связи (тел.: +7 (423)231-07-05; эл. почта: zvyag @piboc.dvo.ru).

В развитых странах общество все большее внимание уделяет проблемам долголетия и здоровья, которые напрямую связаны с качеством питания. В последние годы упор делается на потребление пищи с включением водорослей и продуктов из них, а также на использование лекарственных и лечебно-профилактических препаратов из водорослей. Употребление человеком в пищу водорослей способствует выведению из организма токсинов, регулирует свертываемость крови, снижает уровень холестерина в крови, риск развития атеросклероза, улучшает работу желудочно-кишечного тракта, предотвращает деление раковых клеток и укрепляет иммунитет. Морские водоросли – лучшее средство лечения и профилактики йододефицита и связанных с ним заболеваний щитовидной железы.

Бурые водоросли, наряду с диатомовыми, являются главными продуцентами органического вещества в гидросфере. Условия их обитания крайне разнообразны – это пресные воды, почва и, в особенности, морская среда, где они являются основой морских «лесов» в прибрежных экосистемах. Эти водоросли широко распространены от субполярных зон до экватора, но наибольшее их разнообразие наблюдается в холодноводных и умеренных морях. Размеры водорослей варьируют от миллиметров до 40 метров, например, у макроцистис.

Бурые водоросли морей Дальнего Востока России представляют собой богатый, легко возобновляемый источник уникальных по структуре и свойствам полисахаридов (альгиновых кислот, ламинаранов и фукоиданов). Полисахариды являются главным компонентом биомассы водорослей и выполняют ряд важнейших биологических функций: служат энергетическим резервом, участвуют в построении клеточных стенок, препятствуют потере воды, создают барьер для проникновения в клетку солей или, напротив, обеспечивают избирательное поглощение катионов, необходимых для построения минерального скелета.

В последнее время значительно возрос интерес к производству из бурых водорослей таких ценных полисахаридов, как ламинаран и фукоидан. Ламинаран в перспективе является исходным веществом для получения лекарственных препаратов, повышающих устойчивость иммунной системы. Фукоиданы привлекают внимание наличием у них антираковых, антитромботических, антикоагулянтных и антивирусных свойств [1–4]. Способность этих полисахаридов образовывать комплексы с солями тяжелых металлов позволила получать на их основе препараты для удаления токсинов из организмов [5].

При организации промышленной переработки водорослевого сырья, особенно для получения лечебных или лечебно-профилактических препаратов, необходимы знания о химических свойствах и биологической роли метаболитов водорослей и ферментов, катализирующих их трансформацию. Для создания БАД, пищевых добавок и, в особенности, лекарств очень важна воспроизводимость структурных характеристик препаратов полисахаридов. Поэтому нами большое внимание уделено исследованию влияния различных факторов на состав и структуру полисахаридов водорослей. Стандартизация препаратов полисахаридов затруднена по целому ряду причин. Известно, что каждый вид водоросли синтезирует характерный для него набор полисахаридов, который может содержать несколько структурных типов фукоиданов, ламинаранов и альгиновых кислот. Состав и структура полисахаридов могут зависеть от места, сезона сбора водоросли, ее продуктивного статуса. Условия предобработки водоросли и способ экстракции также влияют на состав и структуру биополимеров [6–9].

АЛЬГИНАТЫ И АЛЬГИНАТ-ЛИАЗЫ

В меньшей степени перечисленные выше факторы влияют на альгиновые кислоты – линейные полисахариды, молекулы которых построены из 1→4-связанных остатков β-*D*-маннуриновой и α-*L*-гулуриновой кислот. Установлено, что альгиновые кислоты вегетативных растений состоят, главным образом, из остатков маннуриновой кислоты, и поэтому подобны друг другу в разных видах водорослей.

Генеративные растения накапливают альгиновые кислоты с большим или меньшим содержанием гулуриновой кислоты, что приводит к видоспецифической разнице в структуре и свойствах альгиновых кислот [10]. Данные о влиянии спороношения на содержание альгиновых кислот в тканях водорослей весьма противоречивы. Одни исследователи отмечали накопление этих полисахаридов в фертильных растениях или частях растений, содержащих репродуктивные структуры [11], другие, напротив, нашли снижение содержания альгината в тканях при развитии соросов [12].

Ферменты, катализирующие расщепление альгиновых кислот, относятся к классу лиаз. Интересно отметить, что в морских организмах широко распространены полиманнуридат-лиазы [13], тогда как о ферментах, катализирующих расщепление 1→4 гликозидных связей между остатками α-*L*-гулуриновой кислоты, в литературе имеются единичные сообщения. Возможно, это связано с преобладанием маннуринов в природе.

Нами из брюхоногого моллюска *Lambis* sp. была выделена гомогенная альгинат-лиаза редкой специфичности, которая классифицирована как поли-1→4-α-*L*-гулуридат-лиаза (КФ 4.2.2.11) [14].

ЛАМИНАРАНЫ И ЛАМИНАРИНАЗЫ

Помимо щелочерастворимой альгиновой кислоты бурые водоросли синтезируют водорастворимые полисахариды ламинараны и фукоиданы. 1→3- и 1→3;1→6-β-*D*-глюканы, к которым относятся ламинараны, в отличие от функционально высоко специализированных природных глюканов, таких как амилоза (резервный полисахарид) или целлюлоза (структурный полисахарид), являются полифункциональными веществами. Такие 1→3- или смешанные 1→3;1→6-β-*D*-глюканы, как курдлан, зимозан, корпускулярный β-*D*-глюкан, шизофиллан широко известны как иммуномодуляторы, противоопухолевые агенты, радиопротекторы [15].

Считается, что ламинараны выполняют резервную функцию, которая, возможно, является не единственной функцией этого полисахарида в бурых водорослях. Многие бурые водоросли содержат незначительные количества ламинарана или не содержат его вовсе [16, 17], что предполагает существование в них других веществ, выполняющих функцию запасных, например, маннита.

Содержание ламинаранов и их структуры зависят от вида водоросли, стадии ее развития, условий произрастания [7, 18, 19]. По химической природе ламинараны являются 1→3;1→6-β-*D*-глюканами с интервалом молекулярных масс от 3 до 6 кДа. На восстанавливающем конце молекул ламинаранов могут находиться остатки маннита (М-цепи) или глюкозы (G-цепи) [20].

Ламинараны из различных видов водорослей значительно различаются как соотношением 1→3- и 1→6-связей, так и способом включения этих связей в цепь β-D-глюкана. Известны две формы ламинаранов, отличающихся по растворимости в холодной воде: «растворимая» и «нерастворимая». К «нерастворимым» относятся ламинараны из *Laminaria hyperborea*, *Turbinaria conoides*, а также одна из фракций ламинаранов *Saccharina gurjanovae*, которые являются практически линейными 1→3-β-D-глюканами (содержание в них 1→6-связанных остатков β-D-глюкозы не превышает 1–2%) [21]. К «растворимой» форме принадлежат ламинараны, обогащенные 1→6-связанными остатками β-D-глюкозы.

Ламинараны из *S. cichorioides* и *Costaria costata* содержат 1→6 связанные остатки глюкозы в виде единичных ответвлений от основной цепи 1→3-β-D-глюкана (соотношение связей 1→3:1→6 = 9:1 и 5:1 соответственно). Ламинаран из *Fucus evanescens* (1→3:1→6 = 2:1) содержит в ответвлениях при С6 как остатки глюкозы, так и гентиобиозы [21]. В ламинаранах из *Ishige okamurai* и *Chorda filum* 1→6-связанные остатки глюкозы включены в основную цепь полисахарида наряду с разветвлениями по положению 6 [4, 22]. Ламинаран из *Eisenia bicyclis* представляет 1→3;1→6-β-D-глюкан, характеризующийся высоким содержанием 1→6-связанных остатков глюкозы (соотношение связей 1→3:1→6 = 3:1), которые присутствуют в этом ламинаране как в виде разветвлений, так и в виде включений в основную цепь [22, 23].

Нами из водоросли *E. bicyclis* был выделен ламинаран, имеющий соотношение связей 1→3:1→6 = 1.5:1 и необычно высокую для ламинаранов молекулярную массу (26–29 кДа). Основная цепь ламинарана содержит остатки 1→6-связанной глюкозы; некоторые остатки глюкозы в ламинаране гликозилированы по положению 6 остатками ламинариполисахаридов; протяженность участков, построенных из 1→3-связанной глюкозы, составляет не более четырех остатков, участков с 1→6-связанной глюкозой – не более трех; большая часть 1→6-связанных остатков глюкозы сосредоточена в ламинаране на невосстанавливающих концах молекул [24].

Таким образом, в ламинаранах представлены различные варианты сочетания 1→3- и 1→6-гликозидных связей, включенных как в основную цепь молекул, так и в ответвления. В ТИБОХ ДВО РАН имеется коллекция ламинаранов, в которой представлены практически все структурные типы этих полисахаридов, что позволяет успешно использовать их при изучении специфичности 1→3-β-D-глюканаз, а также биологической активности как ламинаранов, так и их различных производных.

Ферменты, катализирующие расщепление β-1→3-гликозидных связей в ламинаранах, представлены эндо- и экзо-1→3-β-D-глюканазами и β-D-глюкозидазами. Все эти ферменты относятся к О-гликозидгидролазам, которые классифицированы как КФ 3.2.1- по традиционной для ферментов номенклатуре, разработанной специально созданной Международной Комиссией по ферментам. Результаты ее работы были обнародованы на биохимическом съезде в Москве в 1962 г. Каждые 2 года издаются дополненные варианты этой номенклатуры, которая по сей день остается обязательной для характеристики новых ферментов, поскольку она основана на специфичности и механизме их действия.

В последние десятилетия развитие новых методологических подходов к изучению структуры белков привело к стремительному накоплению данных о структуре О-гликозидгидролаз. В 1991 г. в результате систематизации этих данных была предложена новая классификация О-гликозидгидролаз, согласно которой они подразделя-

ются на семейства в соответствии с их структурным сходством [25]. На сегодняшний день структурная классификация охватывает более 137 000 последовательностей О-гликозидгидролаз и их гомологов, объединенных в 131 семейство. 52 семейства сгруппированы в 14 кланов в зависимости от особенностей пространственной структуры их каталитических доменов (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.htm>).

На основе двухуровневой (семейство/клан) классификации в настоящее время разрабатывается многоуровневая (подсемейство/семейство/клан/суперсемейство) классификация, которая будет учитывать не только гомологию аминокислотных последовательностей и сходство пространственной структуры, но и механизм действия О-гликозидгидролаз [26].

На сегодняшний день установлены аминокислотные последовательности эндо-1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков *Spisula* (= *Pseudocardium*) *sachalinensis* [27], *Chlamys albidus* [28], *Mizuhopecten yessoensis* [29, 30], *Perna viridis* [31], *Littorina sitkana* [32], *Tapes literata* [33], *Haliotis discus hannai* [34]. Структура эндо-1→3-β-D-глюканазы из различных органов морского гребешка *M. yessoensis* была определена независимо двумя научными группами. Структуры ферментов, выделенных из кристаллического стебелька ([29] и внутренних органов моллюска [30], оказались полностью идентичными. Все эндо-1→3-β-D-глюканазы морских моллюсков относятся к 16 семейству О-гликозидгидролаз (GH16).

Семейство GH16 является полиспецифичным и объединяет ферменты, способные катализировать гидролиз широкого спектра углеводов: глюконов, ксилоглюконов, галактанов, каррагинанов, агарозы, лихенанов, включая липополисахарид- и глюкан-связывающие белки беспозвоночных (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.htm>).

Степень структурной идентичности между представителями разных подсемейств GH16 не превышает 10–25% [35]. По всей видимости, они имели общий эволюционный предшественник, но значительно дивергировали в ходе эволюции [36]. Несмотря на различия в аминокислотных последовательностях и субстратной специфичности, все представители GH16 имеют одинаковый тип укладки молекулы в виде β-сэндвича (β-jelly roll) и механизм гидролиза гликозидных связей.

Сравнение каталитических доменов известных эндо-1→3-β-D-глюканаз выявило их большое структурное разнообразие. Степень идентичности аминокислотных последовательностей ферментов прокариот и эукариот не превышает 15–27%. Гомология между последовательностями эндо-1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков составляет 57–93%. Консервативной является последовательность, представляющая активный центр GH16. Она содержит два каталитически активных остатка глутаминовой кислоты, первый из которых является нуклеофилом, а второй – кислотно-основным катализатором. Это было доказано с помощью мутационного анализа ламинариназы из морской бактерии *Rhodotermus marinus* [37], рентгеноструктурного и мутационного анализа эндо-1→3-β-D-глюканазы GHF16 из бактерии *Nocardiopsis* sp. [38], 1→3;1→4-β-D-глюканазы из *Bacillus* [39–41], κ-каррагиназы из *Pseudoalteromonas carrageenovora* [36] и агаразы из *Zobellia galactanivorans* [35]. Вторая консервативная последовательность, обогащенная остатками триптофана, предположительно, является участком связывания субстрата [42].

Анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей эндо-1→3-β-D-глюканаз выявил два консервативных остатка гистидина. С использо-

ванием методов рентгеноструктурного анализа было показано, что один из остатков гистидина входит в активный центр эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из *Nocardioopsis* sp. [38].

Анализ аминокислотных последовательностей эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз показал, что два остатка цистеина являются консервативными для всех эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз моллюсков. Вероятно, эти остатки образуют дисульфидную связь, играющую важную роль для стабилизации молекул. Термостабильность ферментов во многих случаях определяется степенью конформационной подвижности их молекул [33]. Одним из факторов, понижающих конформационную подвижность белка, является присутствие в белковой молекуле дисульфидных связей. Эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы морских моллюсков отличаются содержанием остатков цистеина: ферменты из грешков *Ch. albidus* и *M. yessoensis* имеют по два остатка цистеина, из *T. literata* – три, из *S. sachalinensis* – четыре, из *P. viridis* – семь. Просматривается следующая закономерность – чем больше остатков цистеина (и, вероятно, дисульфидных связей) в молекуле, тем более термостабилен фермент [33].

Большинство известных 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз обладают эндо-типом действия. Только в грибах преобладают глюканазы экзо-типа действия. Интересно отметить, что в грибах морского происхождения, в отличие от морских беспозвоночных и бактерий, также обнаружены 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы экзо-типа действия [43, 44].

При исследовании О-гликозидгидролаз из морских источников до сих пор основное внимание уделяется ферментативному гидролизу полисахаридов. Энзиматический гидролиз гликозидных связей под действием О-гликозидгидролаз идет, в основном, по механизму кислотно-основного катализа и сопровождается либо обращением, либо сохранением конфигурации связи при аномерном атоме углерода. Показано, что ферменты, сохраняющие конфигурацию, способны катализировать не только гидролиз гликозидных связей, но и перенос гликозильного остатка от субстрата (донора) на иной акцептор – молекулу, имеющую, по крайней мере, одну гидроксильную группу. Для О-гликозидгидролаз эта реакция, которая получила название реакции трансгликозилирования, была открыта в 1964 г. [45, 46]. В продуктах реакции трансгликозилирования обнаруживается набор олигозидов, «меченных» по восстанавливающему концу остатком молекулы акцептора. Известно, что трансгликозилирующую активность не проявляют экзо-глюканазы, действующие с обращением конфигурации расщепляемой связи [47]. Большинство «сохраняющих» О-гликозидгидролаз (эндо-глюканаз и гликозидаз) являются потенциальными инструментами для синтеза новых гликозидов.

Отличительной чертой О-гликозидгидролаз из морских организмов по сравнению с гидролазами из наземных источников (лизоцимами, α -амилазами, целлюлазами и т.д.) явилась повышенная способность к реакции трансгликозилирования [20, 48, 49]. Например, для эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз из *P. sachalinensis* и *Ch. albidus* при использовании ламинарана в качестве донора гликозильных остатков, а *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида в качестве акцептора, отношение констант скорости реакций трансгликозилирования и гидролиза k_t/k_r равно 2×10^4 [50]. Для наземных ферментов это соотношение составляет не более, чем 10^2 .

Определение ключевых характеристик О-гликозидгидролаз – специфичности и механизма действия, требует детального анализа структуры продуктов реакций гидролиза и трансгликозилирования. Для решения этих задач успешным оказалось использование методов масс-спектрометрии. Первые работы по масс-

спектрометрическому исследованию реакций, катализируемых глюканазами [51, 52], включая трансгликозилирование [52], были выполнены в ТИБОХ ДВО РАН совместно с Институтом аналитического приборостроения РАН с использованием экспериментальной установки ЭРИАД (ИЭР МС).

Следует заметить, что в более ранних исследованиях реакции трансгликозилирования, в основном, использовали акцепторы, содержащие хромофорную группу [50, 53]. Современные методы масс-спектрометрии позволили расширить круг акцепторов. Например, широкий спектр акцепторов (алифатические спирты, аминокислоты, сахара) был использован в работе японских исследователей, в которой продукты переноса регистрировали с помощью масс-спектрометрии МАЛДИ ТОФ [54]. Трансгликозилирующая активность эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз из моллюсков *P. sachalinensis* и *Ch. albidus* [20] и, позже, из *L. sitkana* [32], *T. literata* [33] и *P. viridis* [31] была исследована с использованием в качестве акцепторов различных спиртов, моносахаридов и гликозидов. Установлено, что структура продуктов реакции трансгликозилирования и скорость их накопления зависела как от структуры агликоновой части исследуемого акцептора, так и от природы фермента.

Показано, что эндо-глюканаза из *L. sitkana* в процессе реакции трансгликозилирования способна синтезировать как β -1 $\rightarrow$ 3-, так и β -1 $\rightarrow$ 4-гликозидные связи, а эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза из *Ch. albidus* катализирует синтез еще и β -1 $\rightarrow$ 6-гликозидной связи [55, 56]. Для эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из *Ch. albidus* обнаружена глюканозилтрансферазная активность, продуктами которой оказались более высокомолекулярные и разветвленные, чем исходный ламинаран, 1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6- β -D-глюканы, обладающие высокой биологической активностью – «транслам» и «антивир» [56].

Очень важно, что методы масс-спектрометрии позволяют одновременно регистрировать продукты гидролиза и трансгликозилирования, что другими методами удавалось осуществить только с большими трудозатратами [55]. Изучение одновременного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования на примере эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз, выделенных из *L. sitkana* и *P. sachalinensis*, методами МАЛДИ и ИЭР МС показало, что трансгликозилирующая способность 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз из морских моллюсков зависит от природы акцептора, донора и ряда других факторов. Так, при использовании в качестве акцептора глицерина значения k_t/k_r эндо-1,3- β -D-глюканаз из *P. sachalinensis* и *L. sitkana* составили 80 и 225 соответственно [32].

Таким образом, к настоящему времени установлено, что эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы морских организмов, первоначально обнаруженные как гидролазы, могут катализировать три типа реакций (гидролиз, трансгликозилирование и глюканозилтрансферазную реакцию), протекающие одновременно и, практически, с одинаковой эффективностью. Механизмы действия и специфичность ферментов этой группы значительно различаются, несмотря на высокую структурную гомологию, особенно в области активных центров.

ФУКОИДАНЫ И ФУКОИДАН-ГИДРОЛАЗЫ

Особое место среди полисахаридов занимают фукоиданы – биологически активные сульфатированные полисахариды, которые биосинтезируются бурыми водо-

рослями, и аналоги которых до сих пор не обнаружены в наземных организмах. Фукоиданы в последние годы стали объектом повышенного внимания и интенсивного исследования. Они представляют собой обширный класс биополимеров, содержание и структура которых варьируют в зависимости от вида водоросли, мест ее произрастания, сезона сбора и многих других факторов. Постоянно растущий интерес к этим полисахаридам объясняется их низкой токсичностью и разнообразной биологической активностью, которая может быть использована при создании медицинских препаратов нового поколения. Биологическая активность этих полисахаридов в отличие от их структур изучается чрезвычайно интенсивно. Из-за недостатка информации о структуре фукоиданов сведения о связи структура/активность для этих полисахаридов практически отсутствуют.

В настоящее время фукоиданы с известными структурными характеристиками можно классифицировать следующим образом: сульфатированные α -*L*-фуканы (1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4- α -*L*-фуканы); сульфатированные фукогалактаны разной структуры. Фукогалактаны чаще всего содержат 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связанные остатки фукозы и галактозы, сульфатированные по положениям 2, реже 3 и/или 4. Известны фукоиданы – фукоглюкурономаннаны, в молекуле которых основная цепь состоит из остатков *D*-глюкуроновой кислоты и маннозы, а разветвления включают в себя *D*-галактозу, *D*-ксилозу и *L*-фукозу; сульфатные группы присоединены к остаткам галактозы и фукозы. Фукоидан, не содержащий фукозы в составе кора, был выделен из бурой водоросли *Hizikia fusiforme* (*Sargassum fusiforme*) [57]. Его главная цепь состояла из чередующихся остатков 2-связанной α -*D*-маннопиранозы и 4-связанной β -*D*-глюкуроновой кислоты с небольшим количеством 4-связанной β -*D*-галактозы. Полисахарид с глюкурономанновым кором был найден нами в *Costaria costata* [58]. Кроме этого, имеются фукоиданы еще более сложного состава – сульфатированные гетерополисахариды, содержащие остатки фукозы, маннозы, ксилозы, уроновой кислоты, галактозы в различных соотношениях.

Методы масс-спектрометрии (МС) оказались очень полезными для изучения фукоиданов. С их помощью нами были исследованы структурные особенности фукоиданов из трех видов бурых водорослей: *S. gurjanovae* [59], *F. evanescens* [60, 61], *S. cichorioides* [62]. Для получения олигосахаридов, доступных для масс-спектрометрического анализа, были разработаны условия деполимеризации фукоиданов разными методами: сольволитическим десульфатированием, автогидролизом и частичным кислотным гидролизом.

Так, нами с помощью химических методов было показано, что фукоидан из *S. gurjanovae* представляет собой галактофукан, сульфатированный и частично ацетилированный как по остаткам фукозы, так и галактозы. Этот фукоидан был деполимеризован в условиях сольволитического десульфатирования и частичного кислотного гидролиза. С помощью МАЛДИ МС среди низкомолекулярных продуктов деполимеризации в процессе сольволиза были обнаружены нейтральные и сульфатированные фукоолигосахариды, а также смешанные олигосахариды. Обнаружение смешанных олигосахаридов свидетельствует о блочном строении фукоидана. В продуктах кислотного гидролиза, напротив, преобладали галактозосодержащие олигосахариды. Размеры блоков, построенных из галактозы, находятся в интервале от двух до пяти моносахаридных остатков, а из фукозы – от двух до одиннадцати остатков.

Таким образом, в условиях кислотного гидролиза более лабильными оказались гликозидные связи между остатками фукозы, а при сольволизе – галактозы. Этот фукоидан отличается от полисахаридов, выделенных из других видов семейства ламинариевых, которые представляют собой сульфатированные 1→3- α -L-фуканы [63, 64], хотя повышенное содержание галактозы отмечалось для фукоиданов из *S. japonica* [2] и *S. cichorioides* [65].

Следует отметить, что в фукогалактане из *Sargassum mcclurei* с помощью МС-анализа нами был обнаружен новый структурный фрагмент, построенный из чередующихся остатков фукозы и галактозы [66].

Классификация фукоидаз до сих пор отсутствует, так как самих ферментов выделено немного. По состоянию на 2011 г. в базе данных BRENDA содержатся сведения о 19 источниках фукоидаз. Для большинства источников показано, что они могут биосинтезировать ферменты, гидролизующие фукоиданы из той или иной бурой водоросли, при этом сведения о структуре субстрата часто вообще отсутствуют, либо очень ограничены. К настоящему времени выделено девять фукоидаз в гомогенном состоянии, установлена первичная структура трех ферментов [67, 68], изучена специфичность трех фукоидаз [67–70]. Все исследованные фукоидазы оказались специфичны к гидролизу α -1→4 связи. Из морской бактерии *Flavobacterium sp.* выделена фукоманноглокуронат-лиаза, действующая только на фукоиданы, имеющие глюкурономаннанный кор [71].

Для гидролиза фукоиданов, имеющих основную цепь, построенную из остатков α -L-фукозы, связанных α -1→3 или α -1→4 связями, необходимы две фукоидазы. Первая должна катализировать гидролиз α -1→3-гликозидных связей между остатками фукозы в молекулах фукоиданов, вторая – α -1→4 связи. Для гидролиза фукоиданов, имеющих более сложное строение, необходимо проводить поиск ферментов с использованием в качестве субстрата целевых фукоиданов.

Поиск фукоидаз осложняется отсутствием быстрых и количественных методов определения их активности. Для поиска фукоидаз и характеристики продуктов гидролиза фукоиданов нами используется электрофоретический метод [70]. В настоящее время мы разработали быстрый метод обнаружения фукоидаз в твердом агаре.

В заключение можно сказать, что фукоиданы и особенно фукоидазы относятся к малоизученным веществам, но интерес к ним только возрастает. Развитие методов исследования этих непростых объектов позволит расширить область их практического применения.

ПРИМЕНЕНИЕ О-ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ МОРСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Из нашего краткого обзора следует, что морские организмы являются перспективным источником новых ферментов с различной специфичностью, способных как к гидролизу, так и к формированию гликозидных связей. Имеется возможность применения ферментов, осуществляющих гидролиз гликанов, в различных биотехнологических процессах: для получения олигосахаридов из природного сырья, для разрушения клеточных стенок растений с целью более полной экстракции полезных веществ, для утилизации отходов микробиологических производств и т.д.

О-Гликозидгидролазы издавна используются как инструменты структурного анализа полисахаридов. Их отличает высокая, часто абсолютная, специфичность действия. Ферменты, расщепляющие полисахариды, как правило, специфичны к конфигурации расщепляемой связи, структуре и конфигурации моносахаридного звена [72]. Избирательная фрагментация полисахаридных цепей, для которой чаще всего используют эндо-ферменты, позволяет решать задачи стандартизации природных биологически активных полисахаридов. Высокая гетерогенность полисахаридных препаратов и отсутствие связи между структурой и биологической активностью затрудняет их использование в медицине. Важную роль в этих исследованиях играют ферменты. Так, ферментативная трансформация природных полисахаридов часто приводит к увеличению их биологической активности. «Сохраняющие» О-гликозидгидролазы, к которым относятся эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы морских моллюсков, способные катализировать реакцию трансгликозилирования, а следовательно формировать новые гликозидные связи, в последние годы широко используются для регио- и стереоспецифичного синтеза *in vitro* различных гликоконъюгатов. Использование для этих целей устойчивых к различным воздействиям и обладающих уникальными свойствами и специфичностью гликозидаз таких морских организмов, многие из которых служат объектами марикультуры (гребешки, устрицы, мидии, трепанги, креветки), имеет реальную перспективу применения в биотехнологии.

Часто неизвестна роль ферментов в межвидовых отношениях. Так, при изучении взаимоотношений морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и бурой водоросли *Saccharina japonica* было замечено, что здоровые, крепкие растения ежом не поедаются. Пищевое предпочтение еж оказывает проросткам, старым растениям и «выбросам» ламинарии – растениям, оторвавшимся от грунта после шторма.

Проведенные нами биохимические исследования показали, что в экстрактах ламинарии первого года жизни содержатся вещества, ингибирующие 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазу – основной пищеварительный фермент морского ежа [73]. В стареющих или разрушенных водорослях эти вещества отсутствовали. В природе ингибиторы часто играют роль регуляторов межвидовых отношений. Подобный способ защиты известен у наземных растений, которые синтезируют ингибиторы пищеварительных амилаз насекомых и травоядных животных [74].

БАД НА ОСНОВЕ ФУКОИДАНА ИЗ *FUCUS EVANESCENS*

Исследования полисахаридов бурых водорослей, проводимые в ТИБОХ ДВО РАН, позволили создать несколько биологически активных добавок к пище (БАД) на основе фукоиданов. В последнее время в России интенсивно развивается рынок БАД. Однако БАД на основе водорослей представляют собой либо измельченные растения, либо, в лучшем случае, их экстракты, тогда как в мировой индустрии БАД явно видна тенденция к использованию индивидуальных веществ с установленными структурами и механизмом биологического действия.

Нами было показано, что *F. evanescens* синтезирует, в основном, фукоиданы, *S. gurjanovae* – ламинараны, *A. fistulosa* – маннуронаны [2, 63, 75, 76, 77], что делает перечисленные водоросли источником практически индивидуальных полисахаридов.

Изучение биологических свойств фукоиданов из дальневосточных водорослей показало, что все эти водоросли заслуживают внимания как источники полисахаридов для создания новых БАД, различающихся полисахаридными композициями [63, 77–85]. Результатом этих исследований явилась разработка безотходных универсальных технологий по переработке водорослей, имеющих различный полисахаридный состав [75], и создание на основе фукоидана из дальневосточной бурой водоросли *F. evanescens* серии БАД «Фуколам®» (Фуколам-С, Фуколам, Фуколам янтарный, Фуколам экстра).

Выбор *F. evanescens* как источника фукоидана для создания новых БАД обусловлен тем, что эта водоросль широко распространена на севере Приморского края, Курильских о-вах, Сахалине, отличается самым высоким содержанием фукоидана по сравнению с другими исследованными водорослями, и не используется как пищевой продукт. Кроме того, водоросль легко добывается, так как растет на мелководье, и поддается культивированию. Противоопухолевый, антикоагулянтный, иммуномодулирующий, антивирусный, гепатопротекторный потенциал фукоидана из *F. evanescens* оказался в числе лучших среди исследованных нами фукоиданов [63, 78–87].

Исследования фукоидана из *F. evanescens*, составляющего основу БАД серии «Фуколам®», показали, что этот полисахарид не токсичен в широком диапазоне доз (от 0.5 до 1 г/кг) как при парентеральном введении, так и при применении *per os*. В реакциях гуморального и клеточного иммунного ответа БАД серии «Фуколам®» проявляют разнообразные физиологические эффекты, зависящие от дозы фукоидана и состояния клеток. Они стимулируют функциональную активность нейтрофилов и нормальных киллеров, проявляют свойства модуляторов продукции цитокинов, стимулируют фагоцитоз и кислородзависимые механизмы бактерицидности макрофагов, обладают антикоагулянтной активностью *in vitro* и *in vivo*, оказывая влияние на различные звенья системы гемостаза с вовлечением как внутреннего, так и внешнего путей свертывания крови, а также системы фибринолиза [84, 85].

В Японии запатентованы и производятся напитки с антикоагулянтными свойствами на основе фукоиданов бурых водорослей, которые особенно показаны пожилым людям как профилактические средства при повышенном тромбообразовании [88]. Эти же напитки (например, Apoidan-U, Kanpaiichiban) обладают стимулирующим действием, облегчают протекание аллергических проявлений, устраняют запоры, предупреждают простуду, улучшают общее состояние [88].

Исследования гипохолестеринемического эффекта Фуколама-С показало, что у мышей, получавших фукоидан в течение 4 недель, в сыворотке крови снижался уровень общего холестерина, увеличивалось содержание липопротеинов высокой плотности, что обеспечивало снижение коэффициента атерогенности крови.

На модели хронического токсического гепатита, индуцированного у мышей CCl_4 , изучено гепатопротекторное действие Фуколама-С. Исследование проводилось с использованием метода магнитно-резонансной томографии, позволяющего получить прижизненную количественную и качественную оценку состояния органов у животных. Установлено, что пероральное введение фукоидана с лечебной и профилактической целями приводит к нормализации морфологической структуры, объема и массы печени, биохимических показателей крови.

В ряде работ было показано, что вещества из бурых водорослей *F. vesiculosus*, *Adenocytis utricularis*, *Cystoseira indica* проявляют противовирусную активность в от-

ношении вирусов иммунодефицита человека, герпеса, ретровируса обезьян, вируса человеческого лейкоза первого типа (HTLV-1) [89–92]. Исследование фукоидана, входящего в состав БАД серии «Фуколам®», показало, что он обладает противовирусной активностью по отношению к вирусу клещевого энцефалита, вирусу Хантаан, вызывающему геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, вирусу HIV [82, 93].

В результате проведенных исследований была определена эффективная суточная доза фукоидана, которая составила 100 мг. Созданные на основе фукоидана из *F. evanescens* и разрешенные к применению в России БАД обладают серией полезных свойств.

Наши дальнейшие исследования направлены на поиск среди дальневосточных водорослей источников, перспективных для создания новых БАД. Полученные результаты позволяют надеяться, что на основе этих полисахаридов или продуктов их химической или ферментативной модификации могут быть созданы новые лекарственные средства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Обзор был подготовлен при поддержке грантов РФФИ (№ 12-04-00669-а) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 12-I-П6-10).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kloareg B., Quatrano R.S. // Ocean. Mar. Biology. 1988. V. 26. P. 259–315.
2. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V., Isakov V.V. // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 294. P. 1–13.
3. Киселева М.И., Шевченко Н.М., Крупнова Т.Н. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2005. Т. 41. С. 51–57.
4. Усов А.И., Чижев. А.О. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 2008–2016.
5. Berteau O., Mulloy B. // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 29R–40R.
6. Skriptsova A.V., Khomenko V.A., Isakov V.V. // J. Appl. Phycol. 2004. V. 16. P. 17–21.
7. Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Tarbeeva D.V. // Mar. Biotechnol. 2012. V. 14. P. 304–311.
8. Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Imbs T.I. // J. Appl. Phycol. 2010. V. 22. P. 79–86.
9. Меньшова Р.В., Лепёшкин Ф.Д., Ермакова С.П., Покровский О.И., Звягинцева Т.Н. // Химия природ. соедин. 2012. Т. 48. С. 823–826.
10. Jothisaraswathi S., Babu B., Rengasamy R. // J. Appl. Phycol. 2006. V. 18. P. 161–166.
11. Nishide E., Kinoshita Y., Anzai H., Uchida N. // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1988. V. 54 P. 1619–1622.
12. Hosoda K. // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1979. V. 45. P. 163–165.
13. Favorov V.V., Vozhova E.I., Denisenko V.A., Elyakova L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 569. P. 259–266.
14. Сильченко А.С., Кусайкин М.И., Захаренко А.М., Звягинцева Т.Н. // Химия природ. соедин. 2013. Т.2. С. 188–190.
15. Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А. // Ред. Сундукова Е.В. Структура и иммунотропное действие 1,3;1,6-β-D-глюкоанов / Владивосток: Дальнаука, 2002. с. 160.
16. Sinha S., Astani A., Schnitzler P., Ray B. // Phytochemistry. 2010. V. 71. P. 235–242.

17. Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241–248.
18. Iwao T., Kurashima A., Maegawa M. // Phycological Research 2008. V. 56. P. 1–6.
19. Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M. // Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 1069–1075.
20. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 453–474.
21. Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1349–1358.
22. Maeda M., Nishizawa K. // Carbohydr. Res. 1968. V. 7. P. 97–99.
23. Usui T., Toriyama T., Mizuno T. // Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. P. 603–611.
24. Menshova R.V., Ermakova S.P., Anasyuk S.D., Isakov V.V., Dubrovskaya Y.V., Kusaikin M.I., Um B.H., Zviagintseva T.N. // Carbohydr. Polymers. 2014. V. 99. P. 101–109.
25. Henrissat B. // Biochem. J. 1991. V. 280. P. 309–316.
26. Наумов Д.Г. // Биохимия 1991. Т. 76. С. 764–780.
27. Kozhemyako V.B., Rebrikov D.V., Lukyanov S.A., Kovalchuk S.N., Agafonova E.V., Sova V.V., Elyakova L.A., Rasskazov V.A. // Comp. Biochem. Physiol. B. 2004. V. 137. P. 169–178.
28. Kovalchuk S.N., Bakunina I.Y., Burtseva Y.V., Emelyanenko V.I., Kim N.Y., Guzev K.V., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 191–197.
29. Kovalchuk S.N., Sundukova E.V., Kusaykin M.I., Guzev K.V., Anastyuk S.D., Likhatskaya G.N., Trifonov E.V., Nurminski E.A., Kozhemyako V.B., Zvyagintseva T.N., Rasskazov V.A. // Comp. Biochem. Physiol. B. 2006. V. 143. P. 473–485.
30. Ojima T., Kumagai Y. // Proc. 4th Intern. Sym. on the Marine Biotechnology and Advanced Materials. Gangneung, Korea. 2008. P. 72–77.
31. Zakharenko A.M., Kusaykin M.I., Kovalchuk S.N., Anastyuk S.D., Bui M.L., Sova V.V., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 2011. V. 346. P. 243–252.
32. Pesentseva M.S., Kovalchuk S.N., Anastyuk S.D., Kusaykin M.I., Sova V.V., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. // J. Mol. Catal. B-Enzymatic. 2012. V. 75. P. 73–79.
33. Захаренко А.М., Кусайкин М.И., Ковальчук С.Н., Сова В.В., Сильченко А.С., Белик А.А., Анастюк С.Д., Буй Минь Лу, Рассказов В.А., Звягинцева Т.Н. // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 1067–1079.
34. Kumagai Y., Ojima T. // Comp. Biochem. Physiol. B. 2009. V. 154. P. 113–120.
35. Allouch J., Jam M., Helbert W., Barbeyron T., Kloareg B., Henrissat B., Czjzek M. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 47171–47180.
36. Michel G., Chantalat L., Duee E., Barbeyron T., Henrissat B., Kloareg B., Dideberg O. // Structure. 2001. V. 9. P. 513–525.
37. Krah M., Misselwitz R., Politz O., Thomsen K.K., Welfe H., Borriss R. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 257. P. 101–111.
38. Fibriansah G., Masuda S., Koizumi N., Nakamura S., Kumasaka T. // Prot.-Struct. Funct. Bioinform. 2007. V. 69. P. 683–690.
39. Hahn M., Keitel T., Heinemann U. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 232. P. 849–858.
40. Juncosa M., Pons J., Querol E., Planas A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 14530–14535.
41. Keitel T., Simon O., Borriss R., Heinemann U. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 5287–5291.
42. Ferrer P., Hedegaard L., Halkier T., Diers I., Savva D., Asenjo J.A. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1996. V. 782. P. 555–565.
43. Burtseva Y.V., Verigina N.S., Sova V.V., Pivkin M.V., Zvyagintseva T.N. // Mar. Biotechnol. 2003. V. 5. P. 349–359.
44. Бурцева Ю.В., Веригина Н.С., Сова В.В., Пивкин М.В., Звягинцева Т.Н. // Прикл. биохим. микробиол. 2003. Т. 39. С. 542–548.
45. Sharon N., Seifter S. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. PC2398–2399.
46. Сова В.В., Песенцева М.С., Ковальчук С.Н., Захаренко А.М., Звягинцева Т.Н. // Биохимия. 2013. Т. 7. С. 962–976.
47. Sinnott M.L. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 1171–1202.
48. Звягинцева Т.Н., Сова В.В., Бакунина И.Ю., Сундукова Е.В., Шевченко Н.М., Ермакова С.П., Елякова Л.А. // Химия в интересах устойчивого развития. 1998. Т. 6. С. 417–426.
49. Сова В.В., Звягинцева Т.Н., Светашева Т.Г., Бурцева Ю.В., Елякова Л.А. // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 1300–1306.

50. Звягинцева Т.Н., Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорган. химия 1984. V. 10. P. 1342–46.
51. Александров М.Л., Безукладников П.В., Грачев М.А., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Кондратьев В.М., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Фридлянский Г.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 12. С. 1689–1692.
52. Безукладников П.В., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Миргородская О.А. // Химия природ. соедин. 1989. Т. 1. С. 54–59.
53. Borriss R., Krah M., Brumer H., Kerzhner M.A., Ivanen D.R., Eneyskaya E.V., Elyakova L.A., Shabalin K.A., Neustroev K.N. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 1455–1467.
54. Kumagai Y., Inoue A., Tanaka H., Ojima T. // Fish. Sci. 2008. V. 74. P. 1127–1136.
55. Звягинцева Т.Н., Евтушенко Е.В., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1206–1214.
56. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В. // Биоорган. химия 1995. Т. 21. С. 218–225.
57. Li B., Wei X.J., Sun J.L., Xu S.Y. // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 1135–1146.
58. Anastuyuk S.D., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Polymers. 2012. V. 90. P. 993–1002.
59. Шевченко Н.М., Анастук С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренко П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. // Биоорган. химия. 2007. V. 33. P. 96–107.
60. Anastuyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 779–787.
61. Anastuyuk S.D., Shevchenko N.M., Ermakova S.P., Vishchuk O.S., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Polymer. 2012. V. 87. P. 186–194.
62. Anastuyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Imbs T.I., Gorbach V.I., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 2010. V. 345. P. 2206–2212.
63. Kusaykin M.I., Bakunina I.Yu., Sova V.V., Ermakova S.P., Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Zaporozhets T.C., Zvyagintseva T.N. // Biotechnol. J. 2008. V. 3. P. 904–915.
64. Усов А.И., Билан М.И. // Усп. химии. 2009. Т. 78. С. 846.
65. Yoon S.J., Pyun Y.R., Hwang J.K., Mourao P.A. // Carbohydr. Res. 2007. V. 342. P. 2326–2330.
66. Thinh P.D., Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastuyuk S.D., Ly B.M., Zvyagintseva T.N. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 1456–1476.
67. Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolut Y., Kervarec N., Yvin J.C., Barbeyron T., Michel G., Kloareg B. // Glycobiology. 2006. V. 16. P. 1021–1032.
68. Takayama M., Koyama N., Sakai T., Kato I. // USA Patent 6489155. 2002.
69. Kusaykin M.I., Chizhov A.O., Grachev A.A., Alekseeva S.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I., Sova V.V., Zvyagintseva T.N. // J. Appl. Phicol. 2006. V. 18. P. 369–373.
70. Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Kurilenko V.V., Zakharenko A.M., Isakov V.V., Zaporozhets T.S., Gazha A.K., Zvyagintseva T.N. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 2413–2430.
71. Sakai T., Kimura H., Kojima K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. // Mar. Biotechnol. 2003. V. 5. P. 70–78.
72. Хорлин А.Я. // Структура и функции активных центров ферментов / Ред. Торчинский Ю.М. Москва: Наука, 1974. P. 39–69.
73. Агаркова В.В., Крупнова Т.Н., Ермакова С.П., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. // Прикл. биохим. микробиол. 2007. Т. 43. С. 511–518.
74. Franco O.L., Rigden D.J., Melo F.R., Grossi-De-Sa M.F. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 397–412.
75. Shevchenko N.M., Imbs T.I., Urvantseva A.M., Kusaykin M.I., Kornienko V.V., Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A. // Patent USA № 7611716. 2009.
76. 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. 2005. V. 320. P. 123–131.
77. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. // Molecules. 2008. V. 13. P. 1671–1695.
78. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М., Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н. // Мед. иммунол. 2004. Т. 1. С. 89–96.
79. Беседнова Н.Н., Шевченко Н.М., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2006. Т. 3. С. 54–58.

80. Lee N.Y., Ermakova S.P., Choi H.K., Kusaykin M.I., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Choi H.S. // *Mol. Carcinog.* 2008. V. 47. P. 629–637.
81. Lee N.Y., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N., Kang K.W., Dong Z., Choi H.S. // *Food Chem. Toxicol.* 2008. V. 46. P. 1793–1800.
82. Кузнецова Т.А., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. // *Антибиот. химиотер.* 2004. Т. 5. С. 83–90.
83. Алексеенко Т.В., Жанаева С.Я., Бенедиктова А.А., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.Н., Беседнова Н.Н., Короленко Г.Л. // *Антибиот. химиотер.* 2005. Т. 50. С. 28–31.
84. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Мамаев А.Н., Момот А.П. // *Антибиот. химиотер.* 2003. Т. 48. С. 11–13.
85. Дрозд Н.Н., Толстенков А., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2006. Т. 11. С. 537–540.
86. Алексеенко Т.В., Жанаева С.Я., Венедиктова А.А., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Короленко Т.А. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2007. Т. 143. С. 657–677.
87. Фильченков А.В., Завилевич М.А., Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н., Запорожец Т.С. // *Эксперим. онкология.* 2007. V. 29. P. 181–185.
88. Sagawa T., Kato I. // *Japan J. Phycol. (Sorui)* 2003. V. 51. P. 19–25.
89. Chattopadhyay K., Mateu C.G., Mandal P., Pujol C.A., Damonte E.B., Ray B., // *Phytochemistry* 2007. V. 68. P. 1428–1435.
90. McClure M.O., Moore J.P., Blanc D.F., Scotting P., Cook G.M., Keynes R.J., Weber J.N., Davies D., Weiss R.A. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1992. V. 8. P. 19–26.
91. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 21770–21776.
92. Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. // *Carbohydr. Res.* 2003. V. 338. P. 153–165.
93. Prokofjeva M.M., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Spirin P.V., Horn S., Fehse B., Zvyagintseva T.N. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 3000–3014.

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА РАЗВИТИЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У РАСТЕНИЙ

А. В. Реунов¹, Л. А. Лапшина, В. П. Нагорская, Л. А. Елякова,
И. М. Ермак, А. О. Барабанова, В. Н. Давыдова,
Т. Н. Звягинцева, Н. М. Шевченко

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

Представлены результаты исследований по изучению влияния полисахаридов (ПС) морских организмов (1,3;1,6-β-D-глюкана, κ/β-каррагинана, фукоидана, хитозана) на развитие инфекций, индуцируемых вирусом табачной мозаики и X-вирусом картофеля. Основное внимание уделено действию ПС на ультраструктуру клеток, в том числе на литический компартмент, а также на активность гидролаз (кислой фосфатазы, протеаз, РНКаз) и состояние вирусных частиц в листьях растений-хозяев.

Ключевые слова: вирусные инфекции; растения; полисахариды; вирусоустойчивость.

Inhibitory effects of polysaccharides on the development of virus infection in plants.

A. V. Reunov¹, L. A. Lapshina, V. P. Nagorskaya, L. A. Elyakova, I. M. Yermak, A. O. Barabanova, V. N. Davydova, T. N. Zvyagintseva, N. M. Shevchenko (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The results on the study of effect of polysaccharides (PS) from marine organisms (1,3;1,6-β-D-glucan, κ/β-carrageenans, fucoidan, chitosan) on the development of infections induced by tobacco mosaic virus and potato virus X are presented. The main attention is given to the study of the action of PS on cell ultrastructure, particularly on lytic compartment as well as on the activity of hydrolases (acid phosphatase, proteases, RNases) and the state of viral particles in leaves of host plants.

Keywords: virus infection, plants, polysaccharides

ВВЕДЕНИЕ

При разработке мер борьбы с фитопатогенами, в частности с вирусами, исследователей привлекает возможность защиты растений, основанная на стимуляции их естественной устойчивости с помощью экологически безопасных природных соединений [1, 2]. Перспективными индукторами устойчивости растений к вирусам являются полисахариды (ПС). К ним относятся 1,3;1,6-β-D-глюканы из грибов [3, 4] и бурых водорослей [5, 6]; 1,3;1,4-β-D-глюкан из лишайника *Cetraria islandica* [7]; хитозан

¹ Автор для связи (+7 (924) 524-54-81; эл. почта: antreunov@mail.ru).

Сокращения: ВТМ – вирус табачной мозаики; ПС – полисахариды; ФВК – фосфорновольфрамовая кислота; ЦВ – центральная вакуоль; ХВК – X-вирус картофеля; ЭР – эндоплазматический ретикулум

[8, 9]; олигосахариды, полученные из ксилоглюкана [10] и галактоглюкоманнана [11]; каррагинаны из красных водорослей [12, 13]; фукоидан из водоросли *Fucus evanescens* [14]. Однако механизмы антивирусного действия ПС остаются малоизученными.

Нами развиваются представления, что важную роль в защите клеток растений от вирусов играет литический компартмент, гидролазы которого, такие как протеазы и РНКазы, могут вызывать деструкцию вирусных частиц [2, 15]. Эти представления поддерживаются данными других авторов.

Показано [16], что вакуолярный процессирующий фермент, идентифицированный в зараженных вирусом табачной мозаики растениях *Nicotiana*, несущих ген устойчивости *N*, играет ключевую роль в индукции вирусопосредованного сверхчувствительного ответа. Получены данные [2], что РНКазы могут вовлекаться в противовирусную устойчивость растений, вызванную различными факторами (действием гиббереллина, стероидных гликозидов, вакцинацией слабыми вирусными штаммами и др.). Сообщалось [17–19], что антивирусные белки из различных растений обладают значительной РНКазной активностью.

В данной работе представлены результаты наших исследований по изучению влияния ПС (1,3;1,6-β-*D*-глюкана, κ/β-каррагинана, фукоидана, хитозана) на внутриклеточное развитие инфекций, вызванных вирусом табачной мозаики (ВТМ) и Х-вирусом картофеля (ХВК) в растительных тканях. Основное внимание уделено действию ПС на ультраструктуру клеток, в том числе на литический компартмент, а также на активность гидролаз (кислой фосфатазы, протеаз, РНКаз) и состояние вирусных частиц в листьях растений-хозяев.

Используемые в работе 1,3;1,6-β-*D*-глюкан и фукоидан получены в лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН. Для получения 1,3;1,6-β-*D*-глюкана применяли метод трансформации ламинарана эндо-1,3-β-*D*-глюканазой из морского моллюска *Chlamys albidus* [20]. Фукоидан выделяли из бурой водоросли *F. evanescens* [21]. Препараты κ/β-каррагинана и хитозана получены в лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН из водоросли *Tichocarpus crinitus* [22] и из панциря краба [23] соответственно.

Влияние ПС на ультраструктуру клеток листьев растений-хозяев и внутриклеточное накопление вирусов. Нами показано [24], что обработка здоровых листьев табака сорта Самсун глюканом (1 мг/мл) сопровождается увеличением в клетках в сравнении с контролем таких морфометрических параметров, как число и объемная плотность митохондрий, а также площадь поверхности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума (ЭР). Это свидетельствует [2] о стимуляции глюканом белоксинтезирующего аппарата. Вместе с тем, при обработке глюканом в клетках несколько активируется литический компартмент, что в первую очередь выражается в увеличении количества элементов агранулярного ЭР [24]. В инфицированных ВТМ листьях табака как обработанных, так и не обработанных глюканом, морфометрические параметры клеток имеют существенно большие значения, чем в здоровых листьях. Однако и в этом случае обработка глюканом способствовала активации органелл, определяющих белоксинтезирующую способность клеток (митохондрий, гранулярного ЭР), а также агранулярного ЭР, являющегося компонентом литического компартмента.

При ультраструктурном исследовании клеток листьев табака, инокулированных ВТМ без глюкана, обнаружено, что через 4 сут после заражения многие клетки со-

держали значительное количество вирусных частиц, которые обычно формировали сравнительно большие скопления в цитоплазме (рис. 1, а). Вирусные частицы в скоплениях заметно варьировали по диаметру: наряду с вирионами нормального диаметра, наблюдались набухшие и «тонкие» частицы. Набухшие вирионы обычно имели электронноплотный вид (рис. 1, б). Нередко вирусосодержащие клетки содержали гранулярные (рис. 1, в) и трубчатые (рис. 1, г) включения, описанные ранее [25]. При этом гранулярные включения обнаруживались сравнительно редко, а трубчатые – довольно часто.

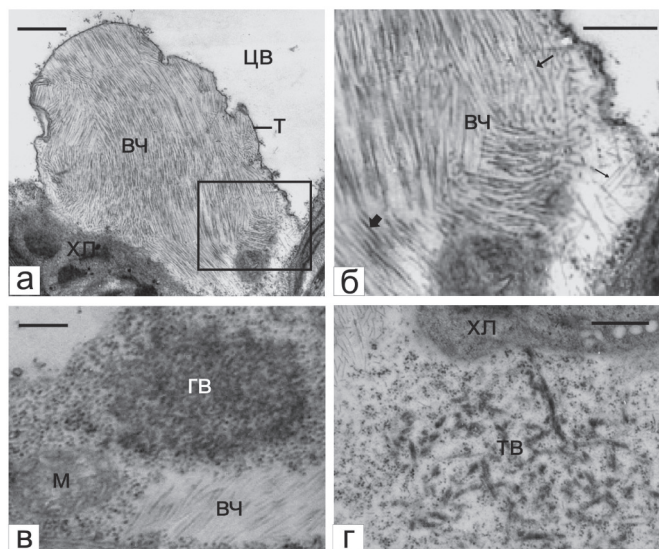


Рис. 1. Участки инфицированных ВТМ клеток мезофилла в листьях табака через 4 сут после инокуляции: а – скопление частиц ВТМ; б – увеличенный участок клетки, ограниченный рамкой (а); в – ВТМ-специфическое гранулярное включение; г – трубчатые включения. Средняя, толстая и тонкая стрелки показывают (б) нормальную, набухшую и тонкую вирусные частицы соответственно. вч – вирусные частицы, гв – гранулярное включение, м – митохондрия, т – тонопласт, тв – трубчатые включения, хл – хлоропласт, цв – центральная вакуоль. Масштаб: 500 нм

Через 4 сут после инокуляции листьев смесью ВТМ (1 мкг/мл) и глюкозы (1 мг/мл) вирусные частицы были рассеяны в цитоплазме клеток (рис. 2 а-в) или сгруппированы в сравнительно небольшие агрегаты (рис. 2 г-з). Рассеянные вирусные частицы наблюдались в электроннопрозрачных цитоплазматических участках, в которых обычно выявлялись как слабо окрашенные палочковидные образования, диаметр которых был значительно меньше, чем нормальный диаметр ВТМ (рис 2, а-в). Когда вирусосодержащие участки цитоплазмы были локализованы на границе с центральной вакуолью (ЦВ), тонопласт часто подвергался дезинтеграции (рис. 2, б, з). Нередко участки клеток с рассеянными вирионами содержали элементы агранулярного ЭР (рис. 2, б) и диктиосомы (рис. 2, в). Цистерны агранулярного ЭР обычно выглядели набухшими.

Вирусные частицы в агрегатах были слабоконтрастными и «тонкими» (рис. 2, г, д, з) либо имели диаметр, заметно превышающий нормальный диаметр ВТМ; в по-

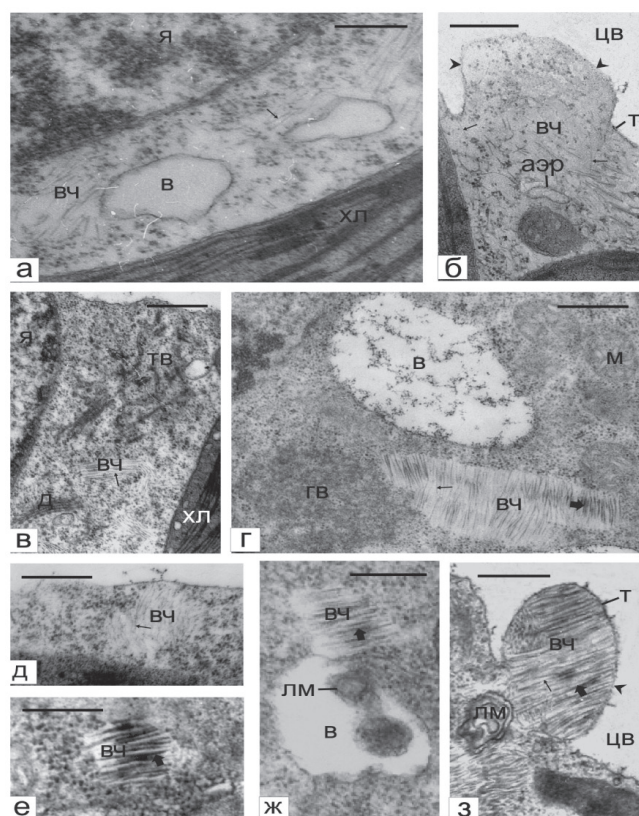


Рис. 2. Участки инфицированных ВТМ клеток мезофилла в листьях табака через 4 сут после инокуляции смесью ВТМ и глюкозы: а-б – частицы ВТМ, рассеянные в электроннопрозрачных участках цитоплазмы; в – диктиосомы, трубчатые включения и рассеянные в цитоплазме вирусные частицы; г – гранулярное включение, вакуоль и скопление частиц ВТМ; д – скопление «тонких» вирусных частиц; е – скопление набухших необычно осмиофильных частиц ВТМ; ж – участок цитоплазмы с частицами ВТМ, контактирующий с вакуолью, содержащей лизисруемые мембранные структуры; з – участок цитоплазмы с вирусными частицами, инвагинирующий в центральную вакуоль. Средняя, толстая и тонкая стрелки показывают нормальные, набухшие и тонкие вирусные частицы соответственно; головки стрелок показывают нарушение целостности тонопласта (б, з). аэр – агранулярный эндоплазматический ретикулум, в-вакуоль, д – диктиосома, лм – лизисруемый материал, я – ядро. Остальные обозначения – те же, что на рис. 1. Масштаб: 500 нм

следнем случае вирионы выглядели необычно осмиофильными (рис. 2, г, е-з). Такие осмиофильные частицы имели тенденцию слипаться друг с другом (рис. 2, е). Часто вирусодержащие участки цитоплазмы сливались с вакуолями, в полости которых выявлялись фрагменты мембранных лизисруемых структур (рис. 2, ж). Во многих клетках участки цитоплазмы с вирусными частицами инвагинировали в полость ЦВ (рис. 2, з). В таких участках обнаруживались лизисруемые мембранные структуры, а тонопласт, граничащий с инвагинациями, подвергался деструкции (рис. 2, з).

Следует отметить, что в клетках листьев, инокулированных смесью ВТМ и глюкозы, гранулярные включения обнаруживались значительно чаще, а трубчатые включения реже, чем в клетках листьев, инокулированных ВТМ без глюкозы [24].

Ранее было показано [25], что гранулярные включения формируются на ранних стадиях размножения ВТМ. С помощью меченных коллоидным золотом антител установлено, что такие включения состоят из кодируемых ВТМ белков (с мол. массами 130 и 180 кДа), являющихся компонентами репликазы ВТМ [26]. Полагают [26], что эти включения являются местом репликации РНК ВТМ. По данным Эсау [25], трубчатые включения формируются из гранулярных на поздних стадиях инфекции. Поэтому тот факт, что при инокуляции листьев смесью ВТМ и глюкана гранулярные включения обнаруживались значительно чаще, а трубчатые включения реже, чем в клетках листьев, инокулированных вирусом без глюкана, свидетельствует о ПС-обусловленной задержке развития инфекции.

В ультраструктурных исследованиях по изучению действия κ/β -каррагинана, а также хитозана на внутриклеточное развитие инфекции, вызванной ВТМ в клетках листьев табака, показано [13, 27], что действие этих ПС сходно с действием глюкана.

При изучении влияния κ/β -каррагинана на развитие инфекции, вызванной ХВК в листьях *Datura stramonium* L., установлено [28], что в начальный период инфекции ПС ингибировал накопление вируса в клетках. Так, через 3 сут после заражения листьев ХВК многие клетки содержали значительное количество вирусных частиц, которые часто были представлены скоплениями в цитоплазме (рис 3, а).

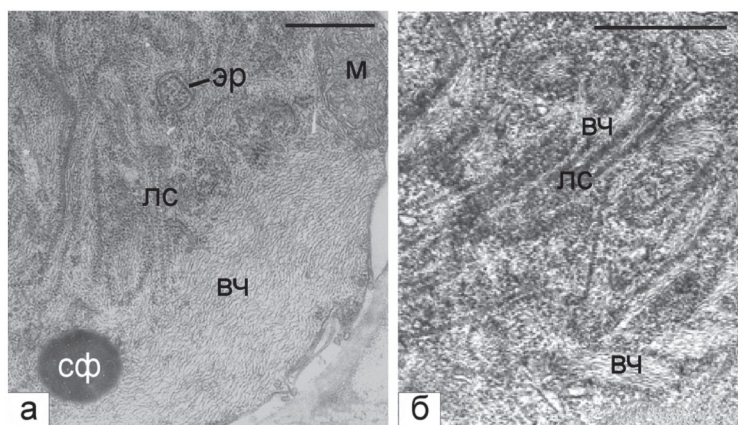


Рис. 3. Участки инфицированных ХВК клеток мезофилла в листьях *D. stramonium* L., не-обработанных (а) и обработанных (б) каррагинаном. лс – ХВК-специфические ламинарные структуры, сф – сферосома, эр – эндоплазматический ретикулум. Остальные обозначения – те же, что на рис. 1. Масштаб: 500 нм

В клетках листьев, обработанных за сутки до инокуляции ХВК каррагинаном, через 3 сут после заражения наблюдалось существенно меньше вирусных частиц, чем в контроле; при этом вирионы обычно были рассеяны в цитоплазме и редко формировали скопления (рис. 3, б).

Обработка здоровых листьев каррагинаном заметно не влияла на структуру клеточных органелл, но вызывала увеличение некоторых морфометрических параметров клеток: объемной плотности ядрышек, числа и объемной плотности митохондрий и вакуолей, площади поверхности мембран гранулярного и агранулярного ЭР, а также диктиосом [28]. В зараженных клетках, особенно под влиянием каррагинана, эти

параметры, существенно возрастали [28]. В ядрах таких клеток наблюдались более крупные, чем в других вариантах, ядрышки (рис. 4, а). Многие митохондрии содержали повышенное количество несколько расширенных крист (рис. 4, б), что указывает [29] на их высокую функциональную активность. Значительно увеличивалось количество гранулярных, а также агранулярных элементов ЭР (рис. 4, в). К вирусиндуцированным признакам, наиболее выраженным при обработке каррагинаном, следует отнести формирование в клетках сферосом (рис. 3, а; 4 в), диктиосом (рис. 4, г), а также образуемых цистернами ЭР структур, представляющих собой [2] цитосегресомы, которые имели на срезах вид замкнутых, кольцевидных профилей (рис. 3, а; 4 г). В цитоплазме зараженных клеток, особенно часто при обработке каррагинаном, обнаруживались электроннопрозрачные участки (рис. 4, в, г), в которых обычно наблюдались расширенные элементы агранулярного ЭР. В подобных участках выявлялись слабоконтрастные, «истонченные» вирусные частицы (рис. 4, в, г).

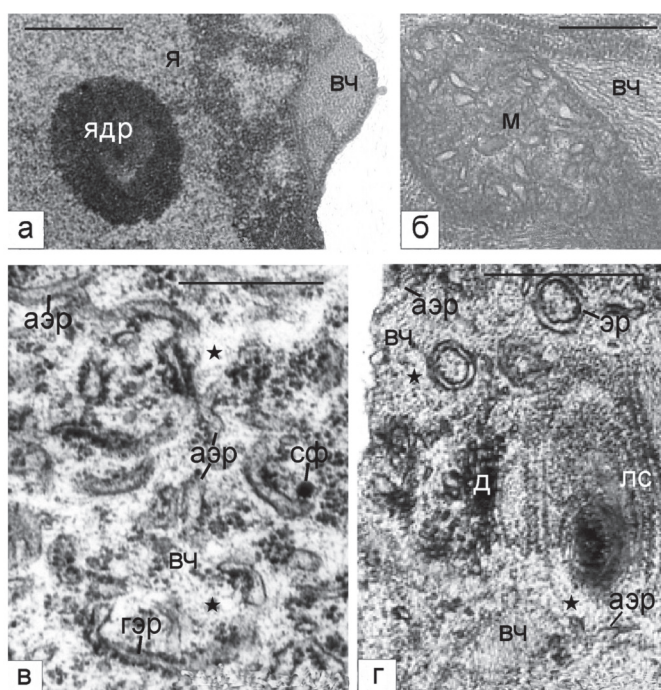


Рис. 4. Участки инфицированных ХВК клеток мезофилла в листьях *D. stramonium* L., обработанных каррагинаном за 24 ч до заражения: а – ядро с крупным ядрышком и небольшим скоплением ХВК; б – митохондрия с большим количеством крист; в – сферосома и элементы гранулярного и агранулярного ЭР в электроннопрозрачном участке цитоплазмы, содержащем слабоконтрастные частицы ХВК; г – диктиосома, агранулярные и кольцевидные профили ЭР, ХВК-специфические ламинарные структуры и рассеянные в электроннопрозрачных зонах цитоплазмы слабоконтрастные частицы ХВК. Обозначения – те же, что на рис. 1, 2, 3. Звездочки (в, г) – электроннопрозрачные зоны в цитоплазме. Масштаб: 500 нм

И в необработанных (рис. 3, а), и в обработанных каррагинаном (рис. 3, б; 4, г) инфицированных ХВК клетках наблюдались ХВК-специфические включения – так называемые ламинарные структуры (ЛС). Как показало исследование серийных сре-

зов [30], эти структуры представляют собой мембраноподобные образования. Установлено, что они содержат белок, не обнаруживающий антигенного родства с ХВК и, следовательно, не являющийся вирусным [30]. Проведенный морфометрический анализ показал, что при обработке каррагинаном в зараженных ХВК клетках объемная плотность ЛС увеличивалась в сравнении с необработанным контролем в 1.5 раза [28].

Ранее было показано [31], что существует обратная зависимость между интенсивностью размножения ХВК и образованием в клетках ЛС. Кроме того, установлено [32], что ЛС могут связывать частицы ХВК и, таким образом, препятствовать их перемещению и репродукции. Таким образом, стимуляция образования ХВК-специфических ЛС, обусловленная каррагинаном, видимо, может рассматриваться как один из защитных противовирусных механизмов, индуцированных ПС.

Влияние глюкана и фукоидана на ультраструктуру и морфометрические параметры клеток листьев *D. stramonium* L., а также на внутриклеточное накопление ХВК было сходным [24, 33] с действием каррагинана.

Проведенные исследования показали, что под действием изучаемых ПС стимулируется белоксинтезирующий аппарат клеток (увеличиваются размеры ядрышек, возрастает количество митохондрий и мембран гранулярного ЭР), что в значительной степени повышает [2] их способность к защитным ответам на внедрение патогена.

В то же время, при обработке ПС в клетках несколько стимулируется литический аппарат, о чем свидетельствует увеличение количества элементов агранулярного ЭР, диктиосом, вакуолей, цитосегресом, сферосом, являющихся [2] компонентами этого аппарата. ЦВ, которая также является компонентом литического компартмента [34], проявляет в зараженных клетках обработанных ПС листьев повышенную (в сравнении с контролем) автофаговую активность, выражающуюся в стимуляции образования инвагинаций тонопласта в эту вакуоль [27]. Содержащиеся в подобных инвагинациях вирусные частицы нередко были трудно различимы и, видимо, подвергались деструкции.

Наблюдаемое расширение цистерн агранулярного ЭР, вероятно, обуславливается нарушением барьерных свойств их мембран, в результате чего содержащиеся в цистернах гидролазы могут высвобождаться в цитозоль. Это, видимо, приводит к развитию внутриклеточных литических процессов и, как следствие, к образованию электронно-прозрачных участков в цитоплазме, наиболее часто наблюдаемых в инфицированных клетках листьев, обработанных ПС. Выявляемые в подобных участках аномальные (слабоконтрастные, “тонкие”) вирусные частицы, по-видимому, образуются в результате деструктивных изменений вирионов под действием содержащихся в этих участках гидролаз.

Влияние ПС на активность гидролаз в листьях. Проведенные нами исследования показали [35], что под действием ПС как в здоровых, так и в зараженных ВТМ листьях табака (Самсун) существенно повышается активность гидролитических ферментов (кислой фосфатазы, РНКазы, протеаз) в сравнении с необработанными листьями. Так, в обработанных глюканом здоровых листьях активность кислой фосфатазы возрастала, в сравнении с контролем, в 1.31, РНК-азы – в 1.46, протеаз – в 1.33 раза (рис. 5). Подобным образом увеличивалась в сравнении с контролем активность этих гидролаз в здоровых листьях, обработанных фукоиданом или каррагинаном: кислой фосфатазы в 1.34 и 1.33, РНКазы – в 1.5 и 1.37, протеаз – в 1.36 и 1.3 раза соответственно. Заражение необработанных ПС листьев ВТМ сопровождалось повышением

(в сравнении с незараженным контролем) активности кислой фосфатазы, в среднем, в 1.36, РНКазы – в 1.38, протеаз – в 1.44 раза (рис. 5). При заражении обработанных ПС листьев ВТМ активность гидролаз в них также существенно увеличивалась. Обработка глюканом и последующее заражение листьев вызывало повышение в них активности кислой фосфатазы, в сравнении с зараженными необработанными листьями, в 1.3, РНКазы – в 1.3, протеаз – в 1.29 раза (рис. 5). При обработке листьев фукоиданом или каррагинаном и заражении через сутки ВТМ активность кислой фосфатазы в них возрастала, в сравнении с контролем, в 1.36 и 1.3, РНКазы – в 1.3 и 1.29, протеаз – в 1.49 и 1.32 раза соответственно.

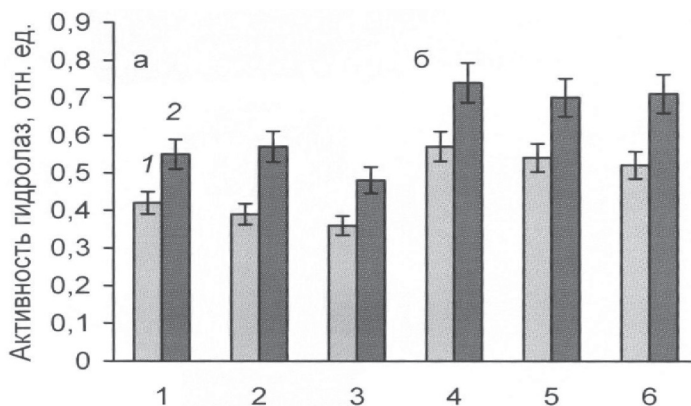


Рис. 5. Активность кислой фосфатазы (1, 4), РНКазы (2, 5) и протеаз (3, 6) в здоровых (а) и зараженных ВТМ (б) листьях табака, необработанных (1) и обработанных (2) глюканом. Различия значимы при $p < 0.05$

Влияние ПС на состояние вирусных частиц в инфицированных листьях. Параллельно с определением активности гидролитических ферментов в не обработанных и обработанных ПС зараженных листьях, мы исследовали состояние вирусных частиц в негативно окрашенных фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) препаратах, приготовленных из этих листьев [35, 36]. Получены данные, что в таких препаратах, наряду с частицами ВТМ нормального диаметра (около 18 нм), присутствуют набухшие и «тонкие» вирионы (рис. 6). В обработанных ФВК препаратах, приготовленных из зараженных листьев, предварительно фиксированных глутаровым альдегидом (ГА), также выявлялись как нормальные, так и аномальные (набухшие и тонкие) вирионы, приблизительно в тех же пропорциях, как и в препаратах из зараженных листьев, не фиксированных ГА. Поэтому наличие аномальных вирусных частиц в исследованных препаратах не может быть артефактом.

В иммуноэлектронномикроскопических исследованиях показано, что частицы нормального диаметра (рис. 7, а-в), а также набухшие вирионы (рис. 7, б) полностью покрываются специфической антисывороткой. «Тонкие» вирусные частицы утрачивают способность декорироваться антителами (рис. 7, в). В случае, когда вирусные частицы имеют непостоянный диаметр, декорирование антисывороткой наблюдается преимущественно на участках вирионов, имеющих сравнительно большой диаметр (рис. 7, а). Контрольная сыворотка и антисыворотка к ХВК не связываются с частицами ВТМ.

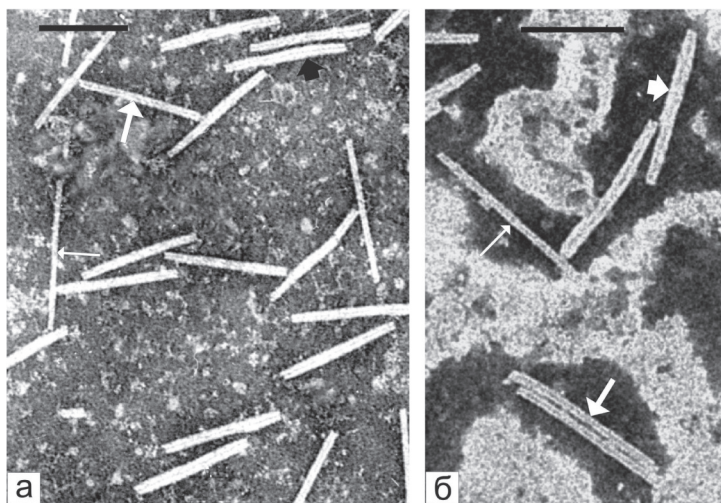


Рис. 6. Контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных глюканом (а) и хитозаном (б) листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы соответственно. Масштаб: 200 нм

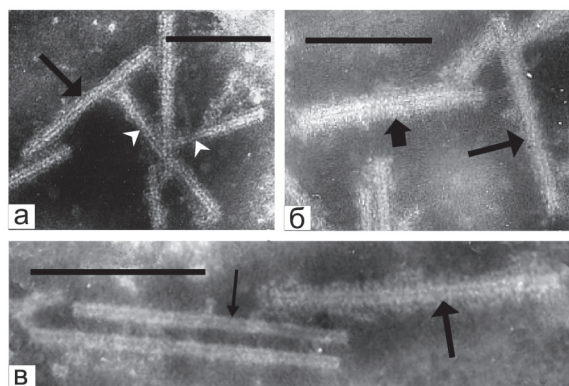


Рис. 7. Обработанные специфической антисывороткой и контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных глюканом листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы соответственно. Головки стрелок (а) показывают частично декорированные антисывороткой частицы ВТМ, имеющие непостоянный диаметр; участки вирионов, имеющие диаметр меньше нормального, не связываются с антителами. Масштаб: 200 нм

Анализ распределения частиц ВТМ по диаметрам показал, что суспензии из листьев, обработанных ПС, содержат существенно больше «тонких» вирионов, чем суспензии из необработанных листьев. Так, препараты, приготовленные из обработанных глюканом листьев, содержали 42% частиц нормального диаметра, 13% набухших и 45% «тонких» частиц (рис. 8). В препаратах из зараженных необработанных глюканом листьев выявлено 59% вирионов нормального диаметра, 11% набухших и 30% «тонких» частиц соответственно (рис. 8).

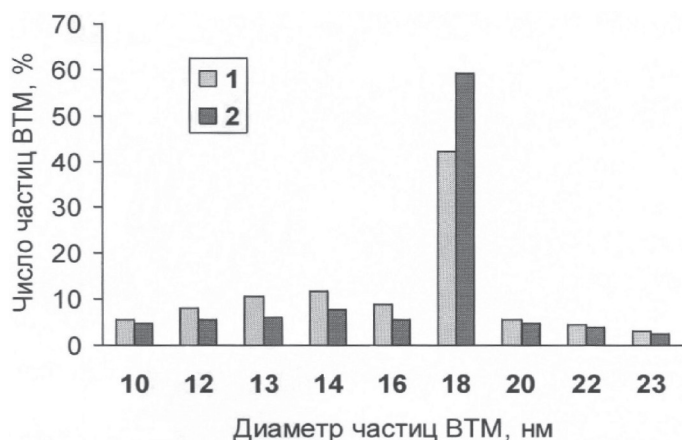


Рис. 8. Распределение частиц ВТМ по величине диаметра в препарате сока, полученном из обработанных глюканом (1) и необработанных (2) листьев табака через 4 сут после заражения

В листьях, обработанных за сутки до заражения фукоиданом, каррагинаном [35] либо хитозаном [27] наблюдалось 39, 45 и 27% частиц нормального диаметра, 11.5, 15.9 и 23% набухших и 49.5, 39.1 и 50% тонких частиц соответственно. Препараты, приготовленные из зараженных необработанных ПС листьев, содержали, соответственно, 58, 56 и 62% вирусных частиц нормального диаметра, 13.6, 14.5 и 13% набухших и 28.4, 29.5 и 25% тонких частиц.

Обнаружение в зараженных ВТМ клетках аномальных вирусных частиц связывается нами с развитием литических процессов, приводящих к деструктивным изменениям вирионов *in vivo*. Мы полагаем, что генерация “тонких” вирионов является двухфазным процессом. Вследствие вирусиндуцированных изменений окружающих условий (напр., pH) белковые субъединицы, вероятно, подвергаются конформационным изменениям, приводящим к их частичному разрыхлению и расплетанию. В результате разрыхления белковых субъединиц вирионы становятся набухшими. Такие вирионы, видимо, способны окрашиваться контрастирующими веществами более интенсивно, чем нормальные вирионы, и поэтому приобретают на ультратонких срезах повышенную электронную плотность. В процессе расплетания полипептидов субъединиц пептидные связи могут “разрезаться” протеазами. Это ведет к появлению “тонких” вирионов, которые выглядят на срезах слабоконтрастными. Подобным образом ранее был описан протеолиз гексонов аденовируса 2 [37]. Тот факт, что тонкие частицы ВТМ, в отличие от вирионов нормального диаметра, утрачивают способность связываться со специфической антисывороткой, по-видимому, обусловливается частичным протеолизом капсидного белка, сопровождающимся элиминацией детерминантных групп, ответственных за связывание с антителами.

Увеличение в зараженных листьях, обработанных ПС, количества аномальных (набухших и «тонких») вирионов свидетельствует о существовании корреляции между ПС-обусловленным повышением активности гидролаз (прежде всего протеаз и РНКаз) и внутриклеточной деструкцией вирионов. Можно полагать, что стимуляция под действием ПС активности гидролаз, способствующая внутриклеточной деструк-

ции вирусных частиц, является индуцированным препаратом защитным механизмом клеток, ограничивающим накопление в них вируса.

Важно подчеркнуть, что при обработке ПС возрастает активность гидролаз в здоровых растительных тканях. Вероятно, повышенный уровень литического потенциала в клетках листьев, обработанных ПС, является фактором, способствующим деструкции потенциального вирусного патогена и, таким образом, стимулирующим вирусоустойчивость растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные показывают, что ПС из морских организмов (1,3;1,6- β -D-глюкан, фукоидан, κ / β -каррагинан, хитозан) ингибируют внутриклеточное накопление вирусных частиц в клетках листьев системно поражаемых растений-хозяев. Такой эффект ПС обусловлен тем, что, с одной стороны, они стимулирует белоксинтезирующую способность клеток, а с другой, несколько активируют литический аппарат и развитие литических процессов. Стимуляция литических процессов приводит к деструкции вирусных частиц и может рассматриваться как индуцированный препаратом защитный механизм клеток, препятствующий накоплению и распространению вируса. Эти данные позволяют рассматривать ПС как перспективные препараты, которые могут использоваться при разработке мер борьбы с вирозами растений. Для повышения эффективности ПС нами планируются исследования по изучению зависимости противовирусной активности этих соединений от их структуры и молекулярного веса. В результате таких исследований будут отобраны сравнительно низкомолекулярные фрагменты ПС со структурой, обладающей максимальной антивирусной активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyon G. D., Reglinski T., Newton A. C. // Plant Pathol. 1995. V. 44. P. 407–427.
2. Реунов А. В. // Вирусный патогенез и защитные механизмы растений / Ред. Журавлев Ю. Н. Владивосток: Дальнаука, 1999. 175 с.
3. Kopp M., Rouster J., Fritig B., Darvill A., Albersheim P. // Plant Physiol. 1989. V. 90. P. 208–216.
4. Rouhier P., Kopp M., Begot V., Bruneteau M., Fritig B. // Phytochemistry. 1995. V. 39. P. 57–62.
5. Елякова Л. А., Лапина Л. А., Реунов А. В., Можяева К. А. // Докл. РАН. 1994. Т. 336, № 5. С. 710–711.
6. Reunov A. V., Lapshina L. A., Nagorskaya V. P., Elyakova L. A. // J. Phytopathol. 1996. V. 144. P. 247–249.
7. Stübler D., Buchenauer H. // J. Phytopathol. 1996. V. 144. P. 37–43.
8. Чирков С. Н. // Прикладн. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. С. 5–13.
9. Давыдова В. Н., Нагорская В. П., Горбач В. И., Калитник А. А., Реунов А. В., Соловьева Т. Ф., Ермак И. М. // Прикладн. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 113–118.
10. Šubíková V., Slováková I., Farkaš V. // Z. PflKrankh. Pflschurz. 1994. Bd. 101. S. 128–131.
11. Slováková L., Lišková D., Capek P., Kubačková M., Kákoniová D., Karácsonyi Š. // Eur. J. Plant Pathol. 2000. V. 106. P. 543–553.

12. Барабанова А. О., Ермак И. М., Реунов А. В., Нагорская В. П., Соловьева Т. Ф. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. С. 80–86.
13. Reunov A. V., Nagorskaya V. P., Lapshina L. A., Yermak I. M., Barabanova A. O. // J. Plant Dis. Protect. 2004. V. 111. P. 165–172.
14. Лапишина Л. А., Реунов А. В., Нагорская В. П., Звягинцева Т. Н., Шевченко Н. М. // Физиол. раст. 2006. Т. 53. С. 274–279.
15. Реунов А. В., Реунов А. А. // Литическая функция клетки / Ред. Адрианов А. В. Москва: Наука, 2008. 181 с.
16. Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. // Science. 2004. V. 305. P. 855–858.
17. Park C. J., Kim K. J., Shin R., Park J. M., Shin Y. C., Paek K. H. // Plant J. 2004. V. 37. P. 186–198.
18. Begam M., Narwal S., Roy S., Kumar S., Lodha M. L., Kapoor H. C. // Biochemistry (Moscow). 2000. V. 71, Suppl. 1. P. S44–S48.
19. Чудхари Н. Л., Ядав О. П., Лодха М. Л. // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 336–341.
20. Звягинцева Т. Н., Елякова Л. А., Исаков В. В. // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 218–225.
21. Zvyagintseva T. N., Shevchenko N. M., Chizhov A. O., Krupnova T. N., Sundukova E. V., Isakov V. V. // J. Exp. Marine Biol. Ecol. 2003. V. 294. P. 1–13.
22. Yermak I. M., Titlaynov E. A., Isakov V. V., Solov'eva T. F. // J. Appl. Phycol. 1999. V. 11. P. 41–48.
23. Давыдова В. Н., Набережных Г. А., Ермак И. М., Горбач В. И., Соловьева Т. Ф. // Биофизика. 2000. Т. 45. С. 641–647.
24. Нагорская В. П. Ультроструктурные аспекты вирусного патогенеза и индуцированной 1,3;1,6-β-D-глюканом устойчивости растений: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Владивосток, 2000. 24 с.
25. Esau K. // Viruses in Plant Hosts. Form, Distribution and Pathologic Effects / Madison, Milwaukee, and London: Univ. Wisconsin Press, 1968. 225 p.
26. Saito T., Hosokawa D., Meshi T., Okada Y. // Virology. 1987. V. 160. P. 477–481.
27. Нагорская В. П., Реунов А. В., Лапишина Л. А., Давыдова В. Н., Ермак И. М. // Цитология. 2011. Т. 53. С. 185–191.
28. Нагорская В. П., Реунов А. В., Лапишина Л. А., Ермак И. М., Барабанова А. О. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 756–761.
29. Заварзин А. А., Харазова А. Д. // Основы общей цитологии / Ленинград: ЛГУ. 1982. 240 с.
30. Shalla T. A., Shepard J. F. // Virology. 1972. V. 49, No. 3. P. 654–667.
31. Реунов А. В. Цитопатология пораженной вирусами (ВТМ, ХВК) растительной клетки и проблема устойчивости растений: Автореф. дис.... д-ра биол. наук. Киев, 1989. 36 с.
32. Лапишина Л. А., Реунов А. В. // Докл. РАН. 1997. Т. 355. С. 716–718.
33. Reunov A. V., Lapshina L. A., Nagorskaya V. P., Zvyagintseva T. N., Shevchenko N. M. // J. Plant Dis. Protect. 2009. V. 116. P. 49–54.
34. Marty F. // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 587–599.
35. Лапишина Л. А., Нагорская В. П., Реунов А. В., Барабанова А. О., Шевченко Н. М., Ермак И. М., Звягинцева Т. Н., Елякова Л. А. // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 567–573.
36. Reunov A. V., Lapshina L. A., Nagorskaya V. P., Elyakova L. A. // J. Plant Pathol. 2011. V. 93. P. 215–218.
37. Everitt E., Persson M. J., Wohlfart C. // FEMS Microbiol. Lett. 1988. V. 49. P. 229–233.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕОМИТИЛАНА – БИОГЛИКАНА ИЗ МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS*

В. И. Молчанова¹, И. В. Чикаловец, О. В. Черников,
Д. Л. Аминин, А. М. Попов, П. А. Лукьянов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.

Исследована биологическая активность неомитилана – полисахарида из мидии *Crenomytilus grayanus*. Показано, что неомитилан не обладает токсическими свойствами *in vivo*, и не проявляет цитотоксической активности *in vitro*. Достоверно установлено, что он проявляет иммуномодулирующее действие: повышает активность лизосомальных ферментов макрофагов и стимулирует формирование активных форм кислорода. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* отмечены цитокин-индуцирующие свойства неомитилана. Неомитилан не вызывает аллергической реакции замедленного типа, таким образом, не обладает провоспалительным действием, что приводит к уменьшению побочных эффектов. При внутрибрюшинном введении неомитилан обеспечивает ослабление воспалительной реакции (уменьшение отека) на каррагинановой модели воспаления. Кроме того, неомитилан обладает УФ-защитным и радиопротекторным действием, а при наружном применении (в составе мази) ранозаживляющей активностью. На экспериментальных моделях ожоговых ран (термических и химических) этот эффект более выражен.

Ключевые слова: биологическая активность, мидии, неомитилан.

Biological activity of neomytilan – bioglycan from the mussels *crenomytilus grayanus*.

V. I. Molchanova¹, I. V. Chikalovets, O. V. Chernikov, D. L. Aminin, A. M. Popov, P. A. Lukyanov
(G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The biological activity of neomytilan – polysaccharide of the mussel *Crenomytilus grayanus* was elucidated. The studies revealed that neomytilan has no toxic properties *in vivo*, without exhibiting cytotoxic activity *in vitro*. It is well established that it possess immunomodulatory effects: neomytilan increases the activity of macrophage lysosomal enzymes and stimulates the formation of reactive oxygen species. Cytokine-inducing properties of neomytilan were marked in experiments *in vitro* and *in vivo*. Neomytilan does not cause delayed type allergic reactions, thus does not have pro-inflammatory effect, which reduces side effects. By intraperitoneal injection it provides attenuation of the inflammatory response (reduction of edema) in the carrageenan model of inflammation. Furthermore, neomytilan has UV-protective and radioprotective effects, and possesses a wound-healing action at external use (as a component of ointment). This effect is more pronounced in experimental models of thermal and chemical burns.

Keywords: biological activity, neomytilan, mussels

¹ Автор для связи (+7 (423) 231-07-19; эл. почта: molchanova_val@mail.ru; molchanova@piboc.dvo.ru).
Сокращения: ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат; ЛПС – липополисахарид из клеточной стенки *Escherichia coli*; АФК – активные формы кислорода; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности.

В настоящее время остро стоит вопрос о создании новых лекарственных препаратов на основе природного сырья, поскольку они часто обладают рядом преимуществ перед синтетическими препаратами: во-первых – это легкая усвояемость организмом человека или животного; во-вторых – отсутствие побочного действия на организм; в-третьих – сравнительно невысокая токсичность; в-четвертых – отсутствие выраженных антигенных свойств и аллергенности. Лекарственные препараты на основе природных соединений, в отличие от синтетических – в большей степени чужеродных для организма, более физиологичны и безопасны.

Ранее из мидии *Crenomytilus grayanus* нами был выделен биогликан – митилан, являющийся гликогеноподобным 1,6-;1,4- α -D-глюканом, отличающимся высокой степенью разветвленности углеводной цепи и наличием небольшого числа 1,2- и 1,3-связанных остатков D-глюкозы в точках разветвления [1]. К настоящему времени накоплен обширный материал о физиологической активности митилана в экспериментах на животных [2-6]. Митилан долгое время применялся в качестве компонента косметических кремов, выпускаемых рядом предприятий России. Однако недостатком этого препарата является сравнительно высокое (3-8%) содержание в нем потенциально аллергогенных белков. Дальнейшая очистка митилана позволила нам получить препарат – неомитилан [7], в котором содержание белка составляет менее 0,5%, что снижает риск возможных аллергических реакций и пирогенного эффекта при его применении. Препарат отлично растворим в воде (до 100 мг/мл).

Биологическую активность неомитилана изучали на моделях *in vitro* – первичной культуре лимфоцитов, периферической крови человека, сыворотке цельной крови человека, макрофагах мыши и эмбрионах морских беспозвоночных. Кроме того, на моделях *in vivo* – мыши линий CBA и BALB, крысы линии Вистар – были изучены противовоспалительные, ранозаживляющие, радиопротекторные и цитокин-индуцирующие свойства препарата.

Наблюдение в течение 12 дней позволило установить, что неомитилан нетоксичен для мышей при внутрибрюшинном введении в дозах от 78.1 до 2500 мг/кг. При действии неомитилана на спленоциты жизнеспособность клеток изменялась в зависимости от концентрации препарата в пределах 75.4-100%, что является допустимым в экспериментах *in vitro*. Следовательно, неомитилан не демонстрировал цитотоксической активности в широком диапазоне доз – от 0.97 до 1000 мкг/мл.

Важными эффекторными клетками неспецифической иммунной системы, выполняющими свою функцию посредством способности к фагоцитозу, являются макрофаги. Активность неомитилана в отношении макрофагов оценивали по способности макрофагов поглощать *Staphylococcus aureus*. Для постановки экспериментов по изучению фагоцитоза использовали бактерии *S. aureus*, меченные ФИТЦ. Оценку фагоцитирующей активности перитонеальных макрофагов мыши проводили согласно протоколу компании Молекуляр Пробс. Показано, что неомитилан способен стимулировать фагоцитоз перитонеальных мышинных макрофагов *in vitro*. Наблюдается куполообразная концентрационная зависимость действия препарата; максимальной стимулирующей концентрацией является 10 мкг/мл, при которой за 2 часа инкубирования неомитилан способен на 20% усилить фагоцитарную активность мышинных макрофагов [7].

Одним из проявлений иммуностимулирующей активности биологически активных веществ является их влияние на функции фагоцитирующих клеток и, в частности,

на лизосомальную активность ферментов макрофагов и формирование АФК. После внутрибрюшинной инъекции неомитилана в дозе 300 мкг/мышь на 4 день установлено статистически достоверное увеличение активности лизосомальных ферментов и формирования активных форм кислорода в перитонеальных макрофагах в 3 и в 1,5 раза соответственно по сравнению с контролем.

Таблица 1. Влияние неомитилана на активность лизосомальных ферментов и на формирование АФК в перитонеальных макрофагах

Исследуемое соединение	Лизосомальная активность, $m \pm SE^*$, %	Формирование АФК, $m \pm SE$, %
Контроль	100	100
Неомитилан	304.26 ± 3.91	148.15 ± 5.86

* $m \pm SE$ – среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

Изучение аллергизирующих свойств неомитилана проводили в соответствии с общепринятой методикой [8]. В результате было выявлено, что неомитилан в дозе 300 мкг/мышь не обладает провоспалительным действием, т.к. не влияет на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей и не оказывают никакого влияния на аллергическую реакцию немедленного типа у мышей (конъюнктивальная проба) [9].

Таблица 2. Влияние неомитилана на гиперергическую реакцию замедленного типа

Группа	Количество животных	Диаметр лапы*, мм		Индекс, %
		контрольной	опытной	
Контроль	10	1.9500 ± 0.0522	2.1200 ± 0.0998	8.7
Неомитилан	10	2.1800 ± 0.1052	2.2700 ± 0.1309	4.12

*Разница с контролем статистически значима.

Для изучения противовоспалительных свойств неомитилана неспецифическое локальное воспаление индуцировали инъекцией δ -каррагинана в подушечку задней лапки беспатогенным мышам линии СВА. Как видно из рис. 1, исследуемый препарат при внутрибрюшинном введении (за 1 час до индукции воспаления каррагинаном) проявляет дозозависимое противовоспалительное действие. В дозе 10 мг/кг противовоспалительная активность неомитилана через 5 часов после индукции каррагинаном была сравнима с действием нестероидного противовоспалительного средства «Ортофен», используемого в качестве положительного контроля в дозе 5 мг/кг.

При создании новых эффективных ранозаживляющих средств, особенно для лоскутных и ожоговых ран, остается актуальным использование препаратов, обладающих выраженным ранозаживляющим, противовоспалительным и регенерирующим действием. Местное медикаментозное лечение можно считать обоснованным, когда оно проводится строго в соответствии с патогенезом раневого процесса, т.е. с учетом фазы его течения. Под местным медикаментозным лечением понимается использование лекарственных препаратов, наносимых на рану в виде мазей, кремов, растворов,

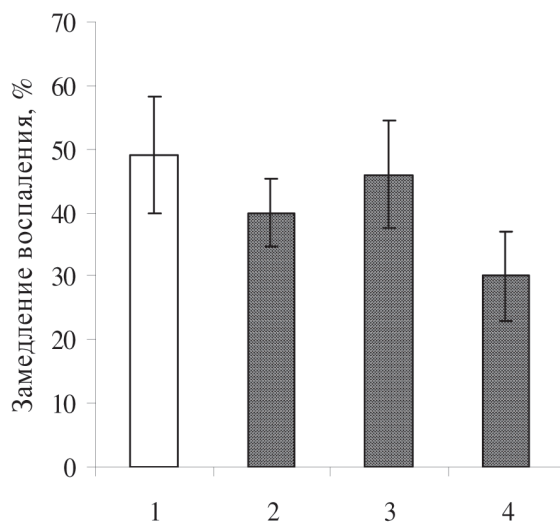


Рис. 1. Противовоспалительная активность неомитилана на модели отека лапки в сравнении с контрольной группой животных (воспаление без лечения препаратами). Группы животных: 1 - ортофен, 5 мг/кг; 2 - неомитилан, 5 мг/кг; 3 - неомитилан, 10 мг/кг; 4 - неомитилан, 20 мг/кг

паст и другими способами. При анализе раневого процесса мы придерживались классификации, предложенной М.И. Кузиным [10], согласно которой этот процесс можно разделить на три фазы: I – фаза воспаления, которая делится на период сосудистых изменений и период очищения раны от погибших тканей; II – фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III – фаза реорганизация рубца и эпителизации. Для изучения ранозаживляющих свойств неомитилана на моделях лоскутных ран, термических и химических ожогов использовали 1%-ную мазь, приготовленную на ланолин-вазелиновой основе. Характер течения репаративного процесса оценивали, измеряя площади раневой поверхности в различные сроки эксперимента. Оценка ранозаживляющей активности исследуемых мазей была проведена на беспатогенных мышах согласно методике [11].

Наибольшая ранозаживляющая активность наблюдалась при лечебном применении мази неомитилана в III фазе раневого процесса как на модели термических, так и послойных лоскутных ран. Причем на экспериментальных моделях термического ожога этот эффект был более выражен. Образование струпа в ранах у животных, которым выполняли аппликации неомитилановой мази, происходило заметно быстрее (уже на 5-й день) по сравнению с метилурациловой мазью (препарат сравнения). В дальнейшем в группе животных, проходивших лечение неомитилановой мазью, регистрировали достоверное ускорение эпителизации раневой поверхности и восстановления кожного покрова. На экспериментальных моделях лоскутных ран неомитилан в составе мазей оказывал сопоставимое с метилурациловой мазью ранозаживляющее действие [12].

Хорошие ранозаживляющие свойства неомитилан показал при рубцевании химического ожога, вызванного концентрированной серной кислотой. Установлено, что при ежедневном накожном нанесении мази на основе неомитилана полная регенерация ткани наступала на 5 дней раньше, чем в контрольной группе животных.

Таблица 3. Оценка действия исследуемых мазей на процесс заживления термических и лоскутных ран

Экспериментальные группы животных	Термические раны		Лоскутные раны	
	Заживление, % ± SD			
	5 день	10 день	5 день	10 день
Контроль	¾*	31.8 ± 11.4	28.6 ± 23	83.9 ± 0.8
Метилурациловая мазь	¾	46.1 ± 7.4	37.3 ± 2.0	91.4 ± 2.1
Мазь на основе неомитилана	11.8 ± 1.1	76.4 ± 5.3	46.5 ± 3.3	94.2 ± 1.8

* $\frac{3}{4}$ Отсутствие эффекта.

Известно, что основную роль в клеточном иммунитете играют активированные макрофаги и Т-лимфоциты. Они держат весь иммунный ответ под контролем, не допуская чрезмерной активации отдельных иммунокомпетентных клеток [13]. Цитокины служат инструментами такого контроля и способны не только активировать, но и подавлять функции других клеток. В запуске специфического иммунного ответа участвуют провоспалительные цитокины, в том числе TNF- α , IL-6 и IFN- γ .

Исследовано влияние неомитилана на спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов клетками периферической крови человека *in vitro*. Для индукции синтеза цитокинов использовали ЛПС. Данные, полученные при исследовании цитокин-стимулирующей активности неомитилана, свидетельствуют о том, что препарат активирует пролиферативные функции иммунокомпетентных клеток *in vitro*. Стимуляция клеток крови полисахаридом приводит к увеличению секреции провоспалительных цитокинов, вероятно, за счет активации моноцитов/макрофагов, ответственных за их синтез (табл. 4). Следует отметить, что в клетках, стимулированных ЛПС в присутствии неомитилана, наблюдается либо снижение экспрессии цитокинов (IL-6), либо уровень цитокинов растет, но гораздо в меньшей степени, чем при их спонтанной индукции (TNF- α , IFN- γ) [7].

Таблица 4. Влияние неомитилана на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов в супернатантах периферической крови доноров *in vitro*

Исследуемый биополимер	Доза биополимера, мкг/мл	Концентрация цитокинов, пкг/мл		
		TNF- α	IL-6	IFN- γ
Индукция без ЛПС				
Контроль	-	419.14 $\pm$ 3.59	1011.77 $\pm$ 20.61	3.12 $\pm$ 0.11
Неомитилан	100	513.29 $\pm$ 64.64	1180.51 $\pm$ 28.11	3.67 $\pm$ 0.2
	5	229.32 $\pm$ 38.25	743.28 $\pm$ 50.71	3.45 $\pm$ 0.48
Индукция с ЛПС				
Контроль	-	1245.23 $\pm$ 66.64	1473.70 $\pm$ 91.25	190.02 $\pm$ 15.10
Неомитилан	100	1337.91 $\pm$ 64.43	1328.58 $\pm$ 65.05	219.67 $\pm$ 13.48
	5	1191.67 $\pm$ 78.29	1212.39 $\pm$ 89.35	209.81 $\pm$ 28.90

Изучено влияние неомитилана на цитокиновый профиль сыворотки крови крыс в модели экспериментального атеросклероза. В крови крыс с экспериментальным атеросклерозом без назначения неомитилана отмечалось повышенное содержание

общего холестерина, β -липопротеинов, холестерина, липопротеинов низкой плотности, индекса атерогенности, увеличение уровней IFN- γ , IL-1, TNF- α и IL-10. Цитокиновый дисбаланс влияет на образование, рост атеросклеротической бляшки и вносит свой вклад в ее дестабилизацию с дальнейшим тромбообразованием. При этом известно, что в физиологических концентрациях IL-6, IL-1 β и TNF- α играют важную роль в регуляции иммунного ответа и тканевого гомеостаза, а в высоких концентрациях эти интерлейкины обладают эффектами, способствующими прогрессированию атеросклеротического процесса [14].

Результаты исследования показали, что неомитилан нивелирует цитокиновый дисбаланс, снижая уровень провоспалительных цитокинов (IFN- γ , IL-1, TNF- α) и усиливая продукцию противовоспалительного цитокина – IL-10 при экспериментальном атеросклерозе. Применение неомитилана способствует уменьшению выраженности воспалительного процесса в артериальной стенке и препятствует прогрессированию заболевания. Кроме того, отмечено достоверное снижение уровней общего холестерина, β -липопротеинов, ЛПНП в сыворотках крови крыс, что свидетельствует о его способности нормализовать показатели липидного обмена. Сочетание противовоспалительных и гипOLIПИдемических свойств неомитилана патогенетически обоснованы и позволяют использовать этот препарат для профилактики и комплексной терапии атеросклероза.

Необходимы дальнейшие исследования по разработке адекватных схем и режима его назначения для коррекции иммунных механизмов воспалительного процесса при атеросклерозе [15].

В настоящее время доказано, что УФ-излучение является наиболее распространенным и постоянно действующим природным физическим фактором. Повышенный уровень УФ-излучения оказывает значительное воздействие на здоровье человека, вызывая различные виды рака кожи, ускоряя старение кожи, способствуя развитию катаракты и других заболеваний, снижает защитное действие иммунной системы. Все это свидетельствует о перспективности работ, направленных на поиск и изучение свойств веществ, способных к эффективной защите от повреждающего воздействия ультрафиолетовой радиации.

Установлен защитный эффект неомитилана на состояние личинок морских беспозвоночных (двустворчатых моллюсков и морских ежей) и лимфоцитов периферической крови человека при ультрафиолетовом облучении. Для каждой из использованных модельных систем выявлено, что предварительная инкубация в присутствии неомитилана существенно снижает морфологические дефекты личинок и жизнеспособность клеток, вызванные сублетальной дозой облучения, нормализует их жизнедеятельность и сдерживает индуцированный облучением апоптоз клеток. Это открывает перспективы использования неомитилана в марикультуре морских беспозвоночных для коррекции неблагоприятных факторов, вызывающих программируемую смерть клеток [16].

Лучевая терапия – метод лечения опухолевых и ряда неопухолевых заболеваний с помощью ионизирующего излучения. Эффект лучевой терапии основан на повышенной чувствительности раковых клеток к ионизирующему излучению. Эффективность лечения часто ограничена наличием лучевых реакций со стороны окружающих тканей. Легочная ткань часто подвергается действию ионизирующей радиации при

лучевой терапии опухолей средостения, молочной железы, пищевода. Поэтому поиск эффективных средств для предотвращения лучевых поражений легких крайне актуален.

Проведено исследование эффективности неомитилана в профилактике лучевых изменений в легких мышей при воздействии ионизирующего излучения. С использованием этого препарата разработан способ профилактики лучевого пневмонита, который обеспечивает снижение патофизиологического действия на здоровые ткани ионизирующего излучения, применяемого в терапевтических целях для лечения опухолей: у мышей достоверно уменьшается толщина альвеолярной стенки по сравнению с таковой у животных, облученных, но необработанных неомитиланом (рис. 2) [17].

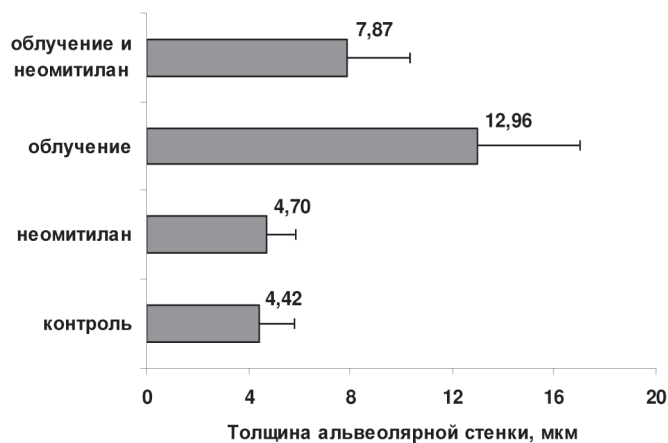


Рис. 2. Соотношение между толщиной альвеолярной стенки у разных групп мышей, использованных в эксперименте

Таким образом, биологическая активность, проявляемая неомитиланом, подтверждает перспективность использования данного биогликана в медицине и косметологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Все исследования выполнены при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грант № 12-I-P6-10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovodova R.G., Glazkova V.E., Mikheyskaya L.V., Molchanova V.I., Isakov V.V., Ovodov Y.S. // Carbohydr. Res. 1992. V. 223. P. 221–226.
2. Крылова Н.Ф., Оводова Р.Г., Беседнова Н.Н., Глазкова В.Е., Молчанова В.И. // Антибиотики и мед. биотехнология. 1985. № 7. С. 600–604.

3. Запорожец Т.С., Оводова Р.Г., Беседнова Н.Н., Молчанова В.И., Никитин А.В., Коваленко Л.Л. // Антибиотики и мед. биотехнология. 1985. № 1. С. 43–47.
4. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Молчанова В.И., Звягинцева Т.Н. // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46, № 7. С. 6–10.
5. Запорожец Т.С., Макаренкова И.Д., Гажва А.К., Кузнецова Т.А., Молчанова В.И., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. // Мед. иммунология. 2003. Т. 5, № 1-2. С. 149–156.
6. Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н., Молчанова В.И., Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. // Мед. иммунология. 2004. Т. 6. № 1-2. С. 89–96.
7. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В., Лукьянов П.А. // Химия природ. соедин. 2013. № 5. С. 681–684.
8. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. // Методические указания по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / М., 2000. С. 25–32.
9. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Аминин Д.Л., Черников О.В., Пислягин Е.А., Лукьянов П.А. // Тихоокеанский мед. журн. 2009. № 3. С. 32–35.
10. Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей // Ред. Кузин М. И., Костюченко Б.М. / М.: «Медицина», 1990. 592 с.
11. Билич Г.Л., Колла В.Э. // В кн.: Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике / Горький: Межвузовский сборник ГГУ, 1978. С. 10–20.
12. Молчанова В.И., Чикаловец И.В., Черников О.В., Попов А.М., Кривошапко О.Н., Лукьянов П.А. // Тихоокеанский мед. журн. 2012. № 1. С. 47–50.
13. Lee Y., Jeon Y.J. // Int. Immunopharmacol. 2005. V. 5. P. 1225-1233.
14. Шаврин А.П., Хогаева Я.Б., Черешнев В.А., Головской Б.В. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. Т. 8, № 3. С. 13–15.
15. Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Красников В.Е., Бычков Е.А., Лукьянов П.А., Чикаловец И.В., Григорюк А.А. // Фундам. исслед. 2012. № 11. С. 46–50.
16. Кипрюшина Ю.О., Одинцова Н.А. Лукьянов П.А. // Биология моря. 2010. Т. 36, № 4. С. 297–302.
17. Гончаров А.В., Апанасевич В.И., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. // Пат. РФ. № 2011133459/15. 2012. Бюл. № 35. 10 с.

НУКЛЕОЗИДКИНАЗЫ МОРСКОГО ЕЖА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОИСПЫТАНИЯХ

Н. А. Терентьева¹, В. А. Рассказов

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.

Из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* выделены тимидин- и уридинкиназы, исследованы их свойства и действие на них некоторых биологически активных веществ. Показано ингибирующее действие нового природного соединения 19-норспонгия-13(16),14-диен-3-она, ряда дитерпеноидов спонгианового ряда, а также сесквитерпенового изотиоцианата из губок рода *Spongia* на биосинтез ДНК в клетках развивающихся эмбрионов *S. intermedius*, а также на активность тимидин- и уридинкиназ эмбрионов морского ежа. Соединения, выделенные из экстракта полыни *Artemisia lagocephala* имели слабую ингибирующую активность в отношении тимидинкиназы. Эксперименты с летальными токсинами бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* показали возможность использования нуклеозидкиназ эмбрионов морского ежа не только для биоиспытаний низкомолекулярных метаболитов, но и для выяснения механизмов действия белковых токсинов на биосинтез нуклеиновых кислот и их предшественников.

Ключевые слова: морской еж; тимидинкиназа; уридинкиназа; спонгианы; *Yersinia pseudotuberculosis*; токсины; биоиспытания

Nucleoside kinases of sea urchin and their using for bioassaying. N. A. Terentyeva¹, V. A. Rasskazov (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Russia)

We have isolated and purified thymidine and uridine kinases from eggs of the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin and studied their properties and the effect of some biologically active substances on these enzymes. We have revealed the inhibitory effects of the new 19-norspongia-13(16),14-diene-3-one as well as the other spongiane diterpenoids and sesquiterpenes isolated from two different species of the genus *Spongia* on the DNA biosynthesis in the developing *S. intermedius* embryos, and on the activity of thymidine and uridine kinases from these cells. The compounds isolated from the extract wormwood *Artemisia lagocephala* produced a little inhibitory effect on thymidine kinase from sea urchin cells. The experiments with lethal toxins isolated from *Yersinia pseudotuberculosis* cells showed the possible using nucleoside kinases from sea urchin embryos not only for biotesting low molecular weight metabolites, but also for elucidating molecular mechanisms of action of these protein toxins on biosynthesis of nucleic acids and their precursors.

Keywords: sea urchin; thymidine kinase; uridine kinase; spongianes; *Yersinia pseudotuberculosis*; toxins; bioassaying.

¹ Автор для связи (+7(423)231-07-03; эл. почта: teren@piboc.dvo.ru).

Сокращения: ТЛТ – термолabileльный летальный токсин, ТСТ – термостабильный летальный токсин.

ВВЕДЕНИЕ

Центральное место в клеточном метаболизме занимает биосинтез нуклеиновых кислот. ДНК и РНК биосинтезируются из пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, которые, в свою очередь, могут биосинтезироваться как из низкомолекулярных компонентов *de novo*, так и из фрагментов ДНК, РНК и их компонентов (основания, нуклеозиды, остатки рибозы или дезоксирибозы) – *salvage* путь биосинтеза. Ключевыми ферментами биосинтеза нуклеотидов и трифосфатов нуклеозидов из нуклеозидов являются нуклеозид- и нуклеотидкиназы. Наличие в клетке этих ферментов определяет возможность утилизации экзогенных нуклеозидов в биосинтезе нуклеиновых кислот.

Наибольший интерес из нуклеозид- и нуклеотидкиназ вызывают ферменты, участвующие в фосфорилировании тимидина до ТТФ. Тимидин является предшественником в биосинтезе ДНК, а в другие макромолекулы напрямую не включается. Тимидинкиназа – (АТФ:тимидин 5'-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.21) катализирует перенос фосфатной группы с АТФ на тимидин с образованием тимидинмонофосфата (ТМФ). Тимидилаткиназа (АТФ:ТМФ фосфотрансфераза, КФ 2.7.4.9) – фермент, ответственный за фосфорилирование ТМФ до ТДФ. Тимидинкиназы обнаружены практически во всех исследованных организмах [1,2]. Как правило, активность фермента коррелирует со скоростью синтеза ДНК и особенно высока в быстро делящихся клетках. Включение меченого тимидина в состав биополимеров клетки часто используют как показатель скорости биосинтеза ДНК.

Уридинкиназа – (АТФ:уридин 5'-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.48) катализирует перенос фосфатной группы с АТФ на уридин с образованием уридинмонофосфата (ТМФ). Данных о рибонуклеозидкиназах в настоящее время недостаточно. По включению меченого уридина можно судить о скорости синтеза РНК, хотя разнообразные метаболические процессы в клетке могут приводить к включению радиоактивной метки из уридина и в другие клеточные биополимеры.

Интерес к ферментативным свойствам нуклеозид- и нуклеотидкиназ связан с применением нуклеозидтрифосфатов и их аналогов, являющихся ингибиторами синтеза ДНК, в качестве инструментов в биохимии и молекулярной биологии, а также при лечении раковых заболеваний и вирусных инфекций. Поскольку в медицинской практике используют производные нуклеозидов, способные проникать в клетки, их эффективность во многом зависит от внутриклеточного фосфорилирования до активной формы трифосфатов при участии нуклеозид- и нуклеотидкиназ. Эти ферменты могут применяться в биотехнологии для получения нуклеозидмоно-, -ди- и трифосфатов, включая радиоактивно меченные. Нуклеозидкиназы могут являться молекулярной мишенью для природных соединений, влияющих на биосинтез клеточных ДНК и РНК, а очищенные ферменты могут найти применение в поиске новых веществ с полезными биологическими свойствами.

Поскольку активность нуклеозид- и нуклеотидкиназ обнаруживается в клетках, где протекает интенсивный биосинтез ДНК, источником для получения этих ферментов могут быть половые продукты. Следует сказать, что морская биота, чья среда обитания характеризуется разнообразными условиями (температура, глубина, соленость, и т.д.), представляет в этом плане большой интерес, поскольку в клетках морских организмов могут биосинтезироваться ферменты, отличающиеся по свойствам от ана-

логичных ферментов наземных организмов. Так, нами было показано, что в процессе созревания яйцеклеток в гонадах морского ежа происходит накопление всех основных компонентов, необходимых для быстрого запуска репликации ДНК сразу после оплодотворения, в том числе ферментов биосинтеза ДНК и предшественников [3].

Мы провели скрининг удельных активностей тимидин- и тимидилаткиназ в экстрактах гонад мужских и женских особей морских беспозвоночных, в которых созревают половые клетки и аккумулируются необходимые для репликации ДНК компоненты, в том числе ферменты биосинтеза нуклеиновых кислот и пул предшественников. В качестве объектов исследования нами были выбраны гонады морских звезд, морских ежей и моллюсков бухты Троица залива Петра Великого и залива Анива (побережье о. Сахалин), собранных во время экспедиционного рейса на НИС «Академик Опарин» (табл. 1).

Таблица 1. Удельная активность тимидин- и тимидилаткиназ в экстрактах гонад морских беспозвоночных¹

Название объекта	Пол	Район сбора	Тимидин-киназа, ед./мг белка	Тимидилат-киназа, ед./мг белка
Морские звезды				
<i>Aphelasterias japonica</i>	м	*	1.12	1.31
<i>Aphelasterias japonica</i>	ж	*	1.05	0.99
<i>Asterias amurensis</i>	м	**	5.44	2.81
<i>Asterias amurensis</i>	м	*	0.99	2.90
<i>Asterias amurensis</i>	ж	*	2.74	1.11
<i>Diplosterias</i> sp.	—	**	6.50	2.95
<i>Diplosterias multipes</i>	—	**	2.36	3.74
<i>Distolasterias nipon</i>	—	**	3.23	2.23
<i>Distolasterias nipon</i>	м	*	1.57	1.37
<i>Distolasterias nipon</i>	ж	*	1.60	1.26
<i>Patiria pectinifera</i>	м	*	6.21	4.37
<i>Patiria pectinifera</i>	ж	*	4.36	4.07
<i>Pseudoarchaster parelii</i>	—	**	3.94	11.91
Морские ежи				
<i>Echinocardium cordatum</i>	ж	**	1.34	0.32
<i>Echinorachnius parma</i>	м	**	1.64	0.74
<i>Echinorachnius parma</i>	ж	**	7.89	0.63
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	м	*	1.19	2.44
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	ж	*	0.91	2.42
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	м	*	1.71	1.81
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	ж	*	0.85	0.96
<i>Strongylocentrotus pulchellus</i>	м	**	5.73	1.11
Двустворчатые моллюски				
<i>Astarte</i> sp.	м	**	9.05	4.86
<i>Astarte</i> sp.	ж	**	9.40	17.81
<i>Callista brevisiphonata</i>	м	*	0.63	0.48
<i>Chlamys rosealbus</i>	м	**	18.53	28.78

Название объекта	Пол	Район сбора	Тимидин-киназа, ед./мг белка	Тимидилат-киназа, ед./мг белка
<i>Chlamys rosealbus</i>	ж	**	9.40	17.94
<i>Crassostrea gigas</i>	—	*	0.22	0.75
<i>Crenomytilus grayanus</i>	м	*	0.73	3.45
<i>Crenomytilus grayanus</i>	ж	*	0.45	2.32
<i>Lottia pelta</i>	—	**	74.14	17.78
<i>Mactra chinensis</i>	м	*	1.25	0.88
<i>Mactra chinensis</i>	ж	*	0.51	1.13
<i>Mactra sulcataria</i>	м	*	0.47	0.72
<i>Mactra sulcataria</i>	ж	*	0.44	1.15
<i>Mercenaria stimpsoni</i>	м	*	0.73	3.45
<i>Mercenaria stimpsoni</i>	ж	*	0.45	2.32
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	ж	**	4.67	30.49
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	м	*	2.33	4.81
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	ж	*	5.12	1.73
<i>Musculus laevigatus</i>	—	**	5.56	2.72
<i>Mya japonica</i>	м	*	3.71	1.16
<i>Mya japonica</i>	ж	*	6.30	0.23
<i>Mytilus edulis</i>	м	*	0.97	0.54
<i>Mytilus edulis</i>	ж	*	0.67	2.05
<i>Peronidia venulosa</i>	м	*	0.43	0.64
<i>Peronidia venulosa</i>	ж	*	2.64	0.28
<i>Spisula sachalinensis</i>	м	*	1.73	3.45
<i>Swiftopecten swifti</i>	м	**	15.06	60.33
<i>Swiftopecten swifti</i>	ж	**	4.12	14.79
Брюхоногие моллюски				
<i>Buccinum middendorffi</i>	м	**	30.44	0.78
<i>Buccinum middendorffi</i>	ж	**	4.27	1.60
<i>Buccinum bayani</i>	ж	**	2.78	13.16
<i>Collus</i> sp.	ж	**	0.94	21.19
<i>Crepidula</i> sp.	-	**	1.92	1.12
<i>Cryptochiton stelleri</i>	м	**	5.92	30.73
<i>Neptunea</i> sp.	ж	**	1.60	3.96

¹ – статистическая обработка результатов не проводилась, поскольку многие объекты были в единичных экземплярах; – не определяли; * – залив Петра Великого; ** – залив Анива.

В экстрактах гонад всех исследованных морских беспозвоночных присутствовали ферменты фосфорилирования тимидина и тимидилата. Максимальная активность тимидинкиназы обнаружена в экстрактах гонад моллюсков *L. pelta*, *B. middendorffi*, *C. rosealbus*, *S. swifti*, собранных в заливе Анива. Достаточно высока активность фермента в гонадах морских звезд *A. amurensis*, *Diplosterias* sp., *P. pectinifera*, а также моллюсков *M. laevigatus*, *M. yessoensis*, *M. japonica* и морских ежей *E. parma* и *S. pulchellus*. Высокая удельная активность тимидилаткиназы, катализирующей фосфорилирование ТМФ до ТДФ, выявлена в экстрактах двустворчатых и брюхоногих моллюсков

(*C. rosealbus*, *L. pelta*, *M. yessoensis*, *S. swifti*, *B. bayani*, *C. sp.*, *C. stelleri*) и в гонадах морской звезды *P. parelii*.

Наши исследования показали, что активность тимидин- и тимидилаткиназ, обнаруженная в эмбрионах нескольких видов морских ежей, изменяется в ходе эмбриогенеза [3-5]. Тимидинкиназа является ключевым ферментом вспомогательного пути биосинтеза предшественников синтеза ДНК. Именно она отвечает за использование тимидина как внутриклеточного происхождения, так и экзогенного. Показано, что эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* способны включать нуклеозиды из окружающей среды и осуществлять их внутриклеточное фосфорилирование [5-6]. При этом с максимальной скоростью в состав ДНК включались тимидин и дезоксицитозин, эффективность включения дезоксиаденозина и дезоксигуанозина была гораздо ниже [6].

Выделение и свойства тимидин-, тимидилат- и уридинкиназ из яйцеклеток морского ежа. Из яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* нами была выделена тимидинкиназа, которая катализировала также фосфорилирование дезоксицитидина [7, 8]. Для проявления ее активности необходимы АТФ, являющийся донором фосфата, и тимидин или дезоксицитидин в качестве акцептора фосфатных групп. Активность фермента проявляется только в присутствии ионов Mg^{2+} , оптимальная концентрация которых составляет 5 мМ. Замена Mg^{2+} на ионы других двухвалентных металлов снижает скорость фосфорилирования тимидина, причем эффективность ионов в реакции уменьшается в ряду $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} = Co^{2+} > Cu^{2+}$ (табл. 2).

Таблица 2. Свойства тимидин- и тимидилаткиназы морского ежа

Характеристики ферментов	Тимидинкиназа	Тимидилаткиназа
Молекулярная масса (гель-фильтрация)	66000	100000
Молекулярная масса (электрофорез с ДДС)	66000	—
Изоэлектрическая точка, pH	5.2	—
Оптимум pH	9-9.5	8.0-8.5
Оптимум Mg^{2+} , мМ	5	10
Оптимум АТФ, мМ	1	2-5
NEM	ингибирует	—
NaCl	активация (15 мМ)	активация (50 мМ)
KCl	активация (15 мМ)	активация (50 мМ)
KPO_4	ингибирует	ингибирует
Доноры фосфатных групп	АТФ > дАТФ	ТТФ > АТФ = ЦТФ > дАТФ
Доноры фосфатных групп	тимидин, дезоксицитидин	ТМФ, дЦМФ

— не определяли

Очищенная (в 1073 раза) тимидилаткиназа морского ежа не содержала примесей фосфатазы и АТФазы [6], имела молекулярную массу 100 кДа и оптимум pH 8–8.5. Для проявления максимальной активности фермента необходимо присутствие 2–5 мМ АТФ, 10 мМ $MgCl_2$ или ионов других двухвалентных металлов, эффективность которых падает в ряду: $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} = Cd^{2+} = Co^{2+}$. Тимидилаткиназа с одинаковой скоростью переносит фосфатные группы как на дТМФ, так и на дЦМФ (табл. 2).

Исследование влияния нуклеозидов и нуклеотидов на активность тимидин- и тимидилаткиназы морского ежа показало, что рибо- и дезоксирибонуклеозиды (за исключением дезоксицитидина в случае тимидинкиназы) не ингибируют активность выделенных ферментов. Дезоксицитидин является субстратом для тимидинкиназы морского ежа, хотя фосфорилируется менее эффективно, чем тимидин. Тимидинмонофосфат – продукт фосфорилирования тимидина, не влиял на активность фермента даже в 10-кратной по отношению к тимидину концентрации. Для эмбрионов морского ежа стадией, лимитирующей скорость образования ТТФ, является фосфорилирование тимидина до ТМФ. Для тимидилаткиназы наиболее эффективным акцептором фосфатных групп является ТМФ, но она способна фосфорилировать и дЦМФ с эффективностью 30%. Нуклеозидмонофосфаты не оказывали влияния на фосфорилирование ТМФ тимидилаткиназой морского ежа. ТТФ ингибировал активность тимидинкиназы по механизму обратной связи, но не действовал на тимидилаткиназу.

Субстратную специфичность тимидинкиназы морского ежа изучали с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в качестве донора фосфатных групп (табл. 3). Такие широко используемые ингибиторы синтеза ДНК, как 5-фтор- и 5-бромдезокситуридин, достаточно эффективно фосфорилируются тимидинкиназой морского ежа. Соединения, содержащие заместители в 3'-положении углеводного компонента нуклеозида, фосфорилируются с низкой скоростью. Можно предположить, что именно скорость фосфорилирования 3'-производных нуклеозидов была определяющей в проявлении ими ингибирующего эффекта на синтез ДНК в развивающихся эмбрионах морского ежа *in vivo* [6].

Таблица 3. Способность тимидинкиназы фосфорилировать некоторые пиримидиновые нуклеозиды и их производные в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$

Соединение	Скорость фосфорилирования (%)	Соединение	Скорость фосфорилирования (%)
Тимидин	100	5-бромдезокситуридин	20
Дезоксицитидин	25	5-иоддезокситуридин	6-
Риботимидин	30	3'-аминотимидин	3-
Цитидин	20	3'-азидотимидин	3-4
5-Фтордезокситуридин	30	3'-азидо-арабинозилтимидин	1

Уридинкиназа, выделенная из морского ежа и очищенная с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-toyopearl, аффинной хроматографии на голубой сепарозе и гель-фильтрации проявляла максимальную активность при pH 8.0 в присутствии 50 мМ АТФ и 5 мМ Mg^{2+} .

Применение нуклеозидкиназ морского ежа для определения биологической активности различных соединений. Гаметы и эмбрионы морского ежа широко используются как модельная система для биотестирования различных соединений, в том числе для исследований в области фармакологии и токсикологии [10]. На ранних стадиях развития эмбрионов в них осуществляется интенсивный и достаточно синхронный синтез ДНК [11]. Высокой скорости биосинтеза ДНК в клетках эмбрионов соответствует и высокий уровень активности ДНК-полимераз [6], а также ферментов, катализирующих синтез нуклеозидтрифосфатов из экзогенных предшественников.

Обладая способностью развиваться в морской воде без каких-либо добавок, эмбрионы морского ежа способны включать в состав ДНК экзогенные нуклеозиды [5]. Это делает их удобной моделью для исследования влияния различных веществ на биосинтез нуклеиновых кислот.

Для включения в состав нуклеиновых кислот экзогенные рибо- и дезоксирибонуклеозиды должны транспортироваться через клеточные мембраны и далее фосфорилироваться в клетке до нуклеозидтрифосфатов, являющихся непосредственными субстратами для РНК- или ДНК-полимеризующих ферментов. Ключевую роль в этом процессе играют нуклеозидкиназы, катализирующие первую ступень фосфорилирования нуклеозидов до их монофосфатов.

Включение радиоактивно меченных предшественников является широко распространенным индикатором скорости синтеза биополимеров клетки. Поскольку тимидин является специфическим предшественником синтеза ДНК, и в другие макромолекулы напрямую не включается, включение меченного тритием тимидина служит показателем скорости синтеза ДНК. По включению меченого уридина можно судить о скорости синтеза РНК.

Получаемые из различных биологических источников низкомолекулярные метаболиты могут быть потенциальными модуляторами биохимических процессов, происходящих в клетках организмов. Нами было исследовано влияние спонгианов из морских губок рода *Spongia* на развитие эмбрионов морского ежа и биосинтез нуклеиновых кислот, определяемый по включению радиоактивно меченных тимидина и уридина эмбриональными клетками [12].

Выделенные из губок *Spongia* spp. терпеноидные метаболиты оказывали влияние на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius*, вызывая их тяжелые морфологические повреждения, остановку развития эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, разрушение клеток и гибель эмбрионов. Повреждающее воздействие на эмбрионы морского ежа зависело от концентрации спонгианов. Все исследуемые соединения в разной степени ингибировали включение тимидина в клетки эмбрионов морского ежа. В присутствии 10 мкг/мл 19-норспонгия-13(16),14-диен-3-она и 19-ацетоксиспонгия-13(16),14-диен-3-она эффективность биосинтеза ДНК уменьшалась практически вдвое. Уровень включения уридина в присутствии соединений в той же концентрации возрастал после 7 часов развития эмбрионов. Это может свидетельствовать о стимулирующем действии спонгианов на биосинтез РНК в клетках эмбрионов морского ежа.

Следует отметить, что меченые нуклеозиды претерпевают внутри клетки сложные метаболические превращения, и это не дает возможности конкретизировать мишени действия спонгианов. Модулирующая активность может быть обусловлена их влиянием на ферменты полимеризации ДНК или РНК, на биосинтез предшественников нуклеиновых кислот. Для выяснения механизма действия спонгианов необходимы эксперименты с индивидуальными ферментами.

Следующим этапом работы стало выяснение действия спонгианов на активность тимидин- и уридинкиназ. Для этих целей были отобраны три вещества: 19-ацетоксиспонгия-13(16),14-диен-3-он – наиболее сильный ингибитор биосинтеза ДНК, 19-гидроксиспонгия-13(16),14-диен-3-он – наиболее сильный стимулятор биосинтеза РНК, и 3 β ,19-диацетоксиспонгия-13(16),14-диен для сравнения, как соединение, показавшее среднюю активность в обоих тестах (рис. 1).

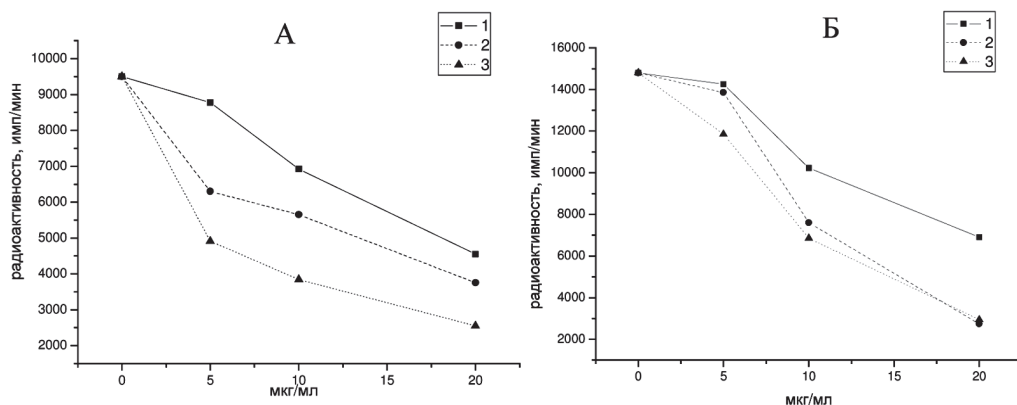


Рис. 1. Влияние спонгианов на активность тимидинкиназы (А) и уридинкиназы (Б).
1 – 19-гидроксиспонгия-13(16),14-диен-3-он; 2 – 3b,19-диацетоксиспонгия-13(16),14-диен;
3 – 19-ацетоксиспонгия-13(16),14-диен-3-он

В диапазоне концентраций 5-20 мкг/мл исследованные спонгианы заметно ингибировали тимидинкиназу (рис. 1А), причем 19-ацетоксиспонгия-13(16),14-диен-3-он обладал наиболее сильным действием, как и в эксперименте на эмбрионах. Это может означать, что мишенью действия данного вещества является тимидинкиназа, отвечающая за первый этап фосфорилирования тимидина до ТТФ.

Аналогичный эксперимент с использованием частично очищенной уридинкиназы показал, что все три соединения ингибировали активность этого фермента (рис. 1Б). Вероятно, стимуляция биосинтеза РНК в эмбрионах морского ежа осуществляется с помощью других механизмов и первый этап фосфорилирования уридина, который осуществляет уридинкиназа, не является лимитирующей стадией в этом процессе.

Следует отметить, что в литературе практически отсутствуют сведения о влиянии спонгиановых дитерпеноидов из морских губок на активность ферментов, связанных с биосинтезом нуклеиновых кислот. Одним из немногих примеров является ингибирующее действие спонгианов на лиазную активность ДНК-полимеразы β [13], которая участвует в репаративном синтезе ДНК, а также обладает дезоксирибозофосфат-лиазной активностью, необходимой для выполнения репаративной функции.

В нашей работе была также исследована биологическая активность ряда соединений, выделенных из гексанового экстракта полыни заячьеголовой *Artemisia lagcephala*, в отношении тимидинкиназы морского ежа (табл. 4) [14]. Показано, что изученные соединения в концентрации 100 мкг/мл ингибируют от 10 до 40% активности фермента, играющего важную роль в биосинтезе предшественников ДНК.

Еще одним объектом изучения влияния на активность нуклеозидкиназ стали белковые токсины *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки (псевдотуберкулеза). К настоящему времени есть сведения о нескольких из них [15], в том числе о термолабильном (ТЛТ) и термостабильном (ТСТ) летальных токсинах. Однако, роль этих токсинов бактерий в патогенезе псевдотуберкулеза не ясна. Остаются неизвестными их молекулярные мишени и механизм действия на клетки организма-хозяина.

Таблица 4. Влияние соединений из гексанового экстракта полыни *A. lagocephala* на активность тимидинкиназы морского ежа

Соединение	Ингибирование активности тимидинкиназы (%) в концентрации	
	100 мкг/мл	200 мкг/мл
Контроль	0	0
3β-Ацетоксициклоартан-24-озонид	8	32
3β-Ацетоксициклоартан-24-аль	17	37
25.26.27-Триснор-3β-ацетоксициклоартан-24-ол	20	33
24.25.26.27-Тетранор-3β-ацетоксициклоартан-24-ол	10	26
Сесквитерпеновый лактон ахиллин	35	52
Оксид кариофиллена	36	48
(1 <i>R</i> .4 <i>S</i>) - <i>p</i> -мент-2ен-1-ол	41	47
Трудноразделимые смеси неразветвленных парафинов Δ ⁴ -3-кетостероидов и Δ ⁵ -стеринов	22	38

Ранее мы исследовали действие ТЛТ и ТСТ *Y. pseudotuberculosis* на развитие эмбрионов морского ежа *S. intermedius* и на биосинтез нуклеиновых кислот и белка в эмбриональных клетках. Оба токсина оказывали повреждающее действие на развивающиеся эмбрионы, вызывая морфологические изменения и, как следствие, гибель эмбрионов [16].

Термолabileльный летальный токсин влиял на метаболические процессы в клетке, ингибируя синтез ДНК и РНК [16, 17], и практически не затрагивал белковый синтез [16]. Термостабильный летальный токсин не оказывал действия на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа, но проявлял выраженное ингибирование синтеза белка [18].

Выяснение действия ТЛТ и ТСТ на активность фосфорилирование тимидина и уридина, катализируемое нуклеозидкиназами морского ежа *S. intermedius* показало, что ТЛТ оказывает некоторый ингибирующий эффект на активность ферментов (рис. 2). Однако даже при очень высоких концентрациях токсина (20–50 мкг/мл) ингибирование не достигает 50%. Причем степень ингибирования практически одинакова как для уридинкиназы, так и для тимидинкиназы. В то же время, ингибирование биосинтеза нуклеиновых кислот, определяемое по включению тимидина и уридина, наблюдается уже при концентрациях ТЛТ 1-2 мкг/мл. Биосинтез ДНК снижается на ~40%, а ингибирование биосинтеза РНК составляет около 70%. Можно предположить, что наблюдаемое ингибирование ТЛТ ферментов биосинтеза предшественников ДНК носит неспецифический характер.

ТСТ *Y. pseudotuberculosis* не влиял на активность тимидин- и уридинкиназ даже в концентрации 100 мкг/мл. Ранее мы показали, что ТСТ в интервале концентрации от 10 до 200 мкг/мл не влиял на включение радиоактивно меченных тимидина и уридина в нуклеиновые кислоты развивающихся эмбрионов морского ежа, а также изолированных из клеток эмбрионов морского ежа ядер [19]. Данные, полученные в экспериментах с нуклеозидкиназами, подтвердили отсутствие действия ТСТ на включение в нуклеиновые кислоты их биосинтетических предшественников.

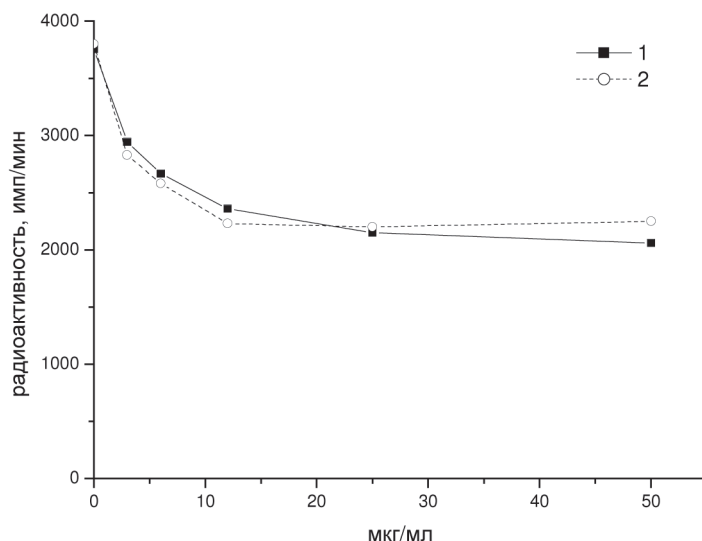


Рис. 2. Действие ТЛТ на активность нуклеозидкиназ морского ежа *S. intermedius*:
1 – активность тимидинкиназы; 2 – активность уридинкиназы

Таким образом, из яйцеклеток морского ежа нами были выделены нуклеозидкиназы, участвующие в биосинтезе предшественников биосинтеза нуклеиновых кислот. Исследованы ферментативные свойства тимидин- и уридинкиназ, показаны возможности их использования для оценки биологической активности низкомолекулярных соединений. В частности, выявлен ингибирующий эффект на активность тимидин- и уридинкиназ дитерпеноидов спонгианового ряда из губок рода *Spongia*, которые ингибировали биосинтез ДНК в клетках развивающихся эмбрионов морского ежа. Установлено, что соединения, выделенные из экстракта полыни, также оказывают небольшую ингибирующую активность в отношении тимидинкиназы морского ежа.

Эксперименты с летальными токсинами *Y. pseudotuberculosis* показали возможность использования тимидин- и уридинкиназ морского ежа не только для биоиспытаний низкомолекулярных метаболитов, но и для выяснения механизмов действия белковых токсинов на биосинтез нуклеиновых кислот и их предшественников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson E.P. // The enzymes / Ed. Boyer P.D. New York and London: Acad. Press. 1973. P. 45–78.
2. Van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. // Pharmacol. Ther. 2003. V. 100, No. 2. P. 119–139.
3. De Petrocellis B., Rossi M. // Devel. Biol. 1976. V. 48. P. 250–257.
4. Nagano H., Mano Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 157. P. 546–557.
5. Suzuki N., Mano Y. // J. Biochem. 1974. V. 75. P. 1349–1362.
6. Терентьев Л.Л., Терентьева Н.А., Рассказов В.А., Александрова Л.А., Викторова Л.С., Краевский А.А. // Биохимия. 1985. Т. 50, Вып. 6. С. 1024–1029.
7. Терентьева Н.А., Захарова Л.А., Терентьев Л.Л., Рассказов В.А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. С. 228–231.

8. Терентьев Л.Л., Терентьева Н.А., Захарова Л.А., Рассказов В.А. // Биохимия. 1990. Т. 55, Вып. 12. С. 2293–2299.
9. Терентьев Л.Л., Терентьева Н.А., Рассказов В.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 99–105.
10. Бузников Г.А., Подмарев В.И. // Объекты биологии развития / Ред. Астауров Б.Л. Москва: Наука. 1975. С. 188–216.
11. Brachet J. // Biochem. Soc. Trans. 1977. V. 5. P. 1184–1190.
12. Ponomarenko L.P., Terent'eva N.A., Krasokhin V.B., Kalinovskiy A.I., Rasskazov V.A. // Nat. Prod. Com. 2011. V. 6, No. 6. P. 773–776.
13. Chaturvedula V.S.P., Gao Z., Thomas S.H., Hecht S.M., Kingston D.G.I. // Tetrahedron. 2004. V. 60. P. 9991–9995.
14. Дудкин Р.В., Беляева А.П., Пономаренко Л.П., Терентьева Н.А., Горовой П.Г., Стоник А.В. // Химия природ. соедин. 2012. № 6. С. 966–967.
15. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. // Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Ред. Сомов Г.П. Владивосток: Примполиграфкомбинат. 2004. 219 с.
16. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Персиянова Е.В., Рассказов В.А. // Тихоокеанский мед. журн. 2010. №3. С. 81–84.
17. Тимченко Н.Ф., Покровский В.К., Терентьева Н.А., Терентьев Л.Л., Рассказов В.А. // ЖМЭИ. 2008. № 6. С. 66–69.
18. Тимченко Н.Ф., Терентьев Л.Л., Недашковская Е.П., Разник Н.В., Рассказов В.А. // Эпидемиол. инфекц. болезни. 2002. № 1. С.22–25.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ГОЛОТУРИЙ

Д. Л. Аминин¹, Е. А. Пислягин, Е. С. Менчинская,
А. С. Сильченко, С. А. Авилов, В. И. Калинин

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-лет Владивостоку, 159.*

Некоторые тритерпеновые гликозиды голотурий проявляют иммуностимулирующий эффект в субтоксических наномолекулярных концентрациях. Инкубирование иммуннокомпетентных клеток с гликозидами вызывает их активацию, выражающуюся в увеличении адгезии иммунокомпетентных клеток на внеклеточном матриксе, увеличении распада клеток и их подвижности, усилении лизосомальной активности макрофагов, включая увеличение числа, размера и закисленности лизосом, образование активных форм кислорода и фагоцитоз. Введение субтоксических доз некоторых гликозидов вызывает увеличение числа антителообразующих клеток, плашкообразных клеток в селезенке мыши. Гликозиды вызывают умеренное образование некоторых цитокинов, восстанавливают уровень некоторых CD-маркеров лимфоцитов, увеличивают бактерицидную активность лейкоцитов и значительно усиливают устойчивость мышей к некоторым патогенным микроорганизмам и радиации. Протеомным анализом установлено, что механизм иммуномодулирующего действия некоторых гликозидов голотурий на иммунные клетки включает регуляцию экспрессии белков, вовлеченных в формирование иммунного ответа, связанных с созреванием лимфоцитов, активацию и слипание, фагоцитоз, перестройку цитоскелета, клеточную адгезию, подвижность и пролиферацию иммунных клеток. С помощью масс-спектрометрии MALDI TOF, включая MALDI TOF MS-визуализацию, а также с использованием меченого ³H-кукумариозиды A₂-2 были изучены фармакокинетические свойства кукумариозиды A₂-2.

Ключевые слова: тритерпеновые гликозиды, голотурии, иммуномодулирующее действие, фармакокинетика, протеомика.

Immunomodulatory activity of triterpene glycosides from sea cucumbers. D. L. Aminin¹, E. A. Pislyagin, E. S. Menchinskaya, A.S. Silchenko, S. A. Avilov, V. I. Kalinin (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, Russia)

Some sea cucumber triterpene glycosides show an immunostimulatory effect at sub-toxic nanomolar concentrations. Incubation of immune cells with the glycosides induces their activation resulting in an increase of immune cell adhesion on an extracellular matrix, enhancement of cell spreading and motility, increase of macrophage lysosomal activity including an increase in the number, size and acidity of lysosomes, ROS formation and phagocytic activity. Injection of sub-toxic doses of some glycosides induces an increase in the number of antibody-producing plaque-forming cells in mouse spleens. The glycosides moderately induce production of some cytokines, restore the level of some CD-markers of lymphocytes, increase bactericidal activity of leucocytes and induce a significant increase in mouse resistance to lethal doses of some pathogenic microorganisms and radiation. Proteomic methods have demonstrated that the mechanism of immunomodulatory action of some glycosides on immune cells includes regulation of the expression of certain proteins associated with lysosome maturation, activation and merging, phagocytosis, cytoskeletal

¹ Автор для связи (тел.: +7 (423) 231-11-68; эл. почта: daminin@piboc.dvo.ru).

reorganization, cell adhesion, mobility and proliferation of immune cells. The pharmacokinetic properties of cucumarioside A₂-2 was determined by MALDI TOF MS. Cucumarioside A₂-2 was absorbed fairly rapidly: the glycoside maximum concentration in tissue homogenate was observed in the first 30 minutes after injection; the minimum values were registered in 3 hours. These results are in agreement with those obtained in the pharmacokinetic study of ³H-cucumarioside A₂-2. It was established by MALDI-IMS that glycoside was mainly located in the tunica serosa part of the spleen and only a small amount was detected within the red and white pulp of the organ. MALDI MS images obtained 15–30 min post dosage clearly reflect high drug concentrations in the regions surrounding the organ followed by its decline in the surface part and a very slight redistribution to the internal part of the spleen.

Keywords: *triterpene glycosides, sea cucumbers, immunomodulatory activity, pharmacokinetic, proteomic.*

Известно, что в мили- и микромолярных концентрациях большинство тритерпеновых гликозидов голотурий проявляют гемолитическую, цитотоксическую, антигрибковую и некоторые другие виды биологической активности, обусловленные мембранотропным действием. В тоже время, в субтоксических наномолярных концентрациях некоторые тритерпеновые гликозиды голотурий проявляют выраженный стимулирующий эффект на некоторые функции различных типов клеток. Впервые стимулирующее влияние гликозидов голотурий на функции иммунных клеток было описано еще в 60–70-е годы прошлого века. Применение смеси тритерпеновых гликозидов из тропической голотурии *Actinopyga agassizi* (так называемый голотурин) в низких концентрациях (0.1–6.0 мкг/мл) вызывало усиление фагоцитоза полиморфоядерных лейкоцитов человека подобно факторам сыворотки, миграцию лейкоцитов, и активировало гемопоэз в костном мозге лягушек. [1, 2].

В эти же годы было начато изучение физиологической активности гликозидов из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica*. Из голотурии *C. japonica* был выделен ряд нативных гликозидов и их десульфатированных производных, различающихся как строением углеводных цепей, так и строением агликонов. Это дало возможность детально изучить зависимость между химическим строением гликозидов и их мембранотропной активностью [3–6].

Известно, что гликозиды голотурий не проявляют антибактериальной активности, но проявляют четко выраженное антифунгальное действие [7]. Уже первые тестирования веществ, полученных из *C. japonica*, показали, что они обладали умеренной противогрибковой активностью, обычной для веществ этого класса [8]. Однако, было установлено также, что сумма тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. japonica* обладает выраженной способностью повышать естественную резистентность животных к инфекциям, вызываемым довольно широким кругом микроорганизмов. Было сделано предположение о том, что в основе усиления кукумариозидами естественной резистентности животных к инфекциям лежит активация мононуклеарной фагоцитарной системы, включающая в себя усиление фагоцитарной и переваривающей способности макрофагов [9–14].

Одними из первых препаратов, созданных на основе тритерпеновых гликозидов кукумарии японской, были КД (суммарная фракция моносulfатированных пентаозидов, в состав которой входят кукумариозиды групп A₀, A₁, A₂ и A₄) и КМ (суммарная фракция кукумариозидов группы A₂, полученная из суммарной гликозидной

фракции). Отмечено, что препарат КД достоверно усиливал защитный эффект корпскулярной энтеробактериальной вакцины на основе *Salmonella minnesota*. Было также показано, что кукумариозиды оказывали выраженное адъювантное действие, вызывая увеличение иммунного ответа на корпскулярные антигены, а также усиление протекторного действия некоторых бактериальных вакцин [11, 13, 14]. Помимо этого было обнаружено, что препарат КД обладает противоопухолевым эффектом и является перспективным для лечения онкологических больных при его совместном использовании с другими противоопухолевыми препаратами [15].

Была обнаружена достаточно высокая эффективность кукумариозидов для профилактики и лечения клещевого энцефалита. Предполагалось, что установленное действие препарата в низких концентрациях может объясняться его гормоноподобным эффектом [16–23].

Было отмечено лечебное действие кукумариозида A_2 -2 в виде препарата КМ-2 при лечении норок, пораженных алеутской болезнью, являющейся главной причиной падежа, снижения продуктивности норок и ценности их шкур [24, 19–21]. В итоге препарат был рекомендован для широкого применения в ветеринарии не только при алеутской болезни, но и с профилактической целью для повышения резистентности и увеличения продуктивности здоровых и больных норок, а также при других заболеваниях [19–21].

В ряде экспериментов были выявлены и другие полезные свойства кукумариозидов. Так, на основе гидролизата из *C. japonica*, содержащего кукумариозиды, была разработана технология получения лечебно-профилактических напитков. Новые продукты применялись в качестве рационального питания у ожоговых больных. Установлено, что кисломолочные напитки с добавлением гидролизата из кукумариозидов способствуют нормализации показателей белкового обмена у больных после хирургических операций, что свидетельствует об уменьшении катаболических и активизации репаративных процессов [25]. По разработанной ТИНРО-центром (Владивосток) технологии также были получены препараты ТИНГОЛ-1 и ТИНГОЛ-2 из кожно-мускульного мешка и внутренностей *C. japonica*. Эти препараты уникальны по содержанию белков, минеральных веществ, витаминов группы В, гексозаминов и сахаров и обогащены тритерпеновыми гликозидами. Средства были рекомендованы для коррекции дефицита белкового обмена при ожоговых поражениях и хирургическом лечении больных и как тонизирующее средство для укрепления иммунной системы, усиления потенции и улучшения общего физического состояния [26].

Благодаря систематическому исследованию иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов голотурий было выяснено, что эти соединения стимулируют главным образом клеточное звено иммунитета, а их активность зависит от химического строения гликозида. Так, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* были изучены пять природных сульфатированных гликозидов из *C. japonica* с одинаковой агликонной частью и различными углеводными цепями (кукумариозид A_2 -2, A_3 , A_4 -2, A_6 -2 и A_7 -1) и два десульфатированных производных (ds-кукумариозид A_2 -2 и ds-кукумариозид A_4 -2). Внутривентральная инъекция этих гликозидов в концентрации 0.2–20 нг/мышь индуцировала в макрофагах увеличение лизосомальной активности в зависимости от дозы, до 250%, по сравнению с контролем. Стимулирующий эффект зависел от химической структуры гликозидов, особое влияние оказывали число и положение сульфатных групп в углеводной части молекул [27].

Была изучена биологическая активность кукумариозидов A_2 -2 и A_7 -1 и их агликона из голотурии *C. japonica* в тестах с использованием эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c. Нативные гликозиды были высоко цитотоксичны для эмбрионов морского ежа с $EC_{50} = 0.3$ мкг/мл и 1.98 мкг/мл соответственно. Агликон практически не проявлял цитотоксическую активность в отношении развивающихся эмбрионов. В субцитотоксических концентрациях (0.001–0.1 мкг/мл) кукумариозид A_2 -2 вызывал двукратное увеличение лизосомальной активности и индуцировал быстрое кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме в мышинных макрофагах. Максимальный стимулирующий эффект наблюдался после 1–2 час культивирования клеток с этим гликозидом. Кукумариозид A_7 -1 показывал более слабый стимулирующий эффект, а в некоторых случаях даже ингибировал лизосомальную активность. Было высказано предположение, что гликозиды из *C. japonica*, в частности кукумариозид A_2 -2, могут выступать в качестве агонистов Ca^{2+} благодаря своим мембранотропным свойствам [28].

Фрондозид А из североатлантической промысловой голотурии *Cucumaria frondosa* в субцитотоксических дозах стимулировал лизосомальную активность макрофагов мыши с максимально эффективной дозой 0.2 мкг/мышь. Эффект сохранялся в течение 10 дней. Фрондозид А стимулировал *in vitro* лизосомальную активность в мышинных макрофагах до 30% в концентрации от 0.1 до 0.38 мкг/мл. Кроме того, этот гликозид усиливал фагоцитоз бактерий *Staphylococcus aureus* макрофагами *in vitro* и стимулировал образование АФК в макрофагах в максимально эффективной концентрации 0.001 мкг/мл.

Фрондозид А увеличивал число антителообразующих клеток (В-клеток в селезенке) *in vivo* с максимально эффективно стимулирующей концентрацией 0.2 мкг/мышь (стимулирующий индекс 1.86). Фрондозид А практически не влиял на образование иммуноглобулина IgM после иммунизации мышей эритроцитами барана, не стимулировал синтез иммуноглобулинов у мышей и несущественно увеличивал образование овальбумин-стимулированных IgM и IgG антител в крови у мышей, иммунизированных овальбумином [29].

Была изучена иммуномодулирующая активность шести моносультатированных тритерпеновых гликозидов (фрондозид A_1 , охотозид B_1 , охотозид A_1 -1, фрондозид А, охотозид A_2 -1 и кукумариозид A_2 -5), выделенных из голотурии *Cucumaria okhotensis*. Данные соединения стимулировали распластывание и лизосомальную активность, а так же образование АФК в перитонеальных макрофагах мышей. Наибольшее распластывание макрофагов и стимулирование их лизосомальной активности было вызвано фрондозидом A_1 , фрондозидом А и кукумариозидом A_2 -5. Все гликозиды стимулировали также образование АФК в макрофагах, но охотозид B_1 вызывал минимальный эффект стимуляции [30].

Было показано, что кукумариозид A_2 -2 в концентрации 0.02 мкг/мл значительно улучшал морфологические и поведенческие параметры макрофагов. Доказано, что в экспериментах *in vitro* гликозид стимулировал адгезию клеток на внеклеточный матрикс, степень распластывания и увеличивал скорость движения макрофагов практически в два раза [31].

Недавно была изучена иммуномодулирующая активность серии тритерпеновых гликозидов (кукумариозидов I_2 , Н, A_5 , A_6 , B_2 и B_1) из голотурии *Eupentacta fraudatrix* в тестах с перитонеальными макрофагами мышей. Кукумариозиды I_2 , A_5 и B_2 вызыва-

ли увеличение лизосомальной активности в макрофагах на 15–17% в диапазоне концентраций 1–5 мкг/мл. Было отмечено, что стимуляция лизосомальной активности макрофагов зависит от структуры агликона и углеводной цепи и не имеет прямой корреляции с цитотоксической активностью гликозидов [32].

Недавно был предложен липид-сапониновый иммуностимулирующий комплекс (ТІ-комплекс), являющийся носителем для белковых антигенов, который состоит из смеси тритерпенового гликозида кукумариозида A_2 -2, холестерина и полярного липида моногалактозилдиацилглицерида (МГДГ) из морских макрофитов, взятых в весовом соотношении 3:2:6. Указанный комплекс представляет собой ультрамикроскопические тубулы с диаметром тубул около 40 нм. Описано применение указанного комплекса в качестве вакцинного препарата на мыши. В некоторых случаях вместо кукумариозида A_2 -2 применяли другой тритерпеновый гликозид из голотурии *Apostichopus japonicus* – голотоксин A_1 . Использование комплекса обеспечивало усиление иммуногенности бактериального антигена как в отношении специфического, так и неспецифического иммунного ответа, а также позволяло понизить или удалить полностью гемолитическую активность гликозидов и исключить воспалительные, болевые, токсические и гемолитические эффекты вакцин. Такие препараты могут найти применение в медицине в качестве адъювантов [33–37].

При изучении иммунизации мышей ТІ-комплексом, состоящим из различных МГДГ, кукумариозида A_2 -2 и YOmpF, была выявлена зависимость между иммуностимулирующим эффектом ТІ-комплексов и микровязкостью входящих в их состав гликолипидов. Показано, что адъювантный эффект ТІ-комплексов, в состав которых входили МГДГ, выделенные из водорослей *Zostera marina*, *Ahnfeltia tobuchiensis* и *Laminaria japonica*, был в 2.8, 2.3 и 1.3 раза эффективнее контроля. Предполагается, что МГДГ также способны влиять на цитокиновый механизм в иммунологической регуляции. Полученные результаты свидетельствуют, что липидную «нановязкость» можно использовать в новой стратегии оптимизации иммунного ответа на белковые антигены в составе липидных частиц [38].

На основе тритерпеновых гликозидов, выделенных из дальневосточной голотурии *C. japonica*, было создано новое иммуномодулирующее средство кумазид, представляющее собой комплекс моносультатированных гликозидов (в основном кукумариозид A_2 -2) с холестерином в молярном соотношении 1:2 [39]. Кумазид в наномолярных концентрациях не проявлял гемолитической активности и умеренно стимулировал лизосомальную активность лимфоцитов, образование АФК в человеческих нейтрофилах. Препарат индуцировал продукцию некоторых цитокинов (IL-6, IFN- γ , TNF- α), восстанавливал уровень некоторых CD-маркеров лимфоцитов человека (CD3, CD4 и CD8), после предварительной инкубации клеток с гидрокортизоном повышал фагоцитоз и бактерицидную активность лейкоцитов крови человека. Кроме того, кумазид вызывал значительное увеличение резистентности мышей к смертельным дозам некоторых патогенных микроорганизмов, таких как *Staphylococcus aureus* и *Yersinia pseudotuberculosis* [40].

Иммуномодулирующими свойствами кумазида отчасти объясняется и противоопухолевый эффект этого препарата при его применении *in vivo* в экспериментах на мышах с привитой асцитной или солидной формой карциномы Эрлиха. Обнаружено, что кумазид обладает способностью ингибировать развитие опухоли, причем наиболее значительная противоопухолевая активность наблюдалась при профилактическом

введении препарата или в комбинированной схеме, когда препарат вводили до и после инокулирования опухоли. Кроме того, было отмечено, что кумазид проявляет синергизм при сочетанном действии с 5-фторурацилом [41].

В ходе исследований физиологической активности гликозидов голотурий было установлено, что кукумариозиды оказывают профилактическое и лечебное действие при поражении лабораторных животных ионизирующим излучением. При изучении воздействия препарата КМ на популяцию плюрипотентных стволовых клеток было показано, что на 5-е сутки после облучения усиливалась пролиферация и миграция стволовых клеток, а в более поздние сроки наблюдался рост клеточной массы селезенки [42, 43, 18]. Введение облученным животным кукумариозида A_2 -2 приводило к заметному увеличению числа кариоцитов бедренной кости и увеличению количества клеток селезенки облученных мышей, получавших препарат, в 2–3 раза. При этом возрастало и число выживших стволовых клеток костного мозга. Одновременно наблюдалось увеличение выживаемости облученных животных до 47%. Необходимо отметить, что предельные дозы веществ, стимулирующие пролиферацию, примерно в 200 раз меньше среднетоксических [44].

Было установлено радиозащитное действие кумазида. В этих экспериментах самкам мышей линии CD-1 вводили кумазид по профилактической схеме, а затем облучали мышей, используя гамма-терапевтический аппарат с источником излучения ^{60}Co (доза облучения составляла 6.5 Гр, мощность дозы 1.14 Гр/мин). Радиопротекторный эффект кумазида сопровождался увеличением процента выживаемости и СПЖ радиоактивно облученных животных, увеличением скорости восстановления показателей клеточного состава периферической крови, функции кроветворения, клеточности кроветворных (костный мозг бедренной кости) и лимфоидных (тимус, селезенка) органов и количества полипотентных стволовых кроветворных клеток. Наибольшую эффективность препарат проявляет в дозе 1 мкг/кг при профилактическом подкожном введении за 4 дня до облучения животных [45].

С помощью методов протеомики было показано, что механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида A_2 -2 и фрондозид А связаны с регуляцией экспрессии некоторых белков, участвующих в формировании клеточного иммунного ответа спленоцитов селезенки мыши. Белки, экспрессия которых регулируется гликозидами, вовлечены в процессы лизосомального созревания и слияния, фагоцитоза, преобразование цитоскелета, клеточной адгезии, подвижности и пролиферации иммунных клеток. Кукумариозид A_2 -2 и фрондозид А аналогичным образом регулируют экспрессию таких белков, как NSFL1, кофактор p47 и hnRNP K (регуляция вниз), а также Septin-2, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, и GRB2-related adaptor protein 2 (регуляция вверх), которые принимают участие в процессах созревания, активации и слияния лизосом, фагоцитозе, реорганизации цитоскелета, клеточной адгезии, подвижности и пролиферации иммунных клеток [46].

Было показано, что кукумариозид A_2 -2 в наномолярных концентрациях связывается и встраивается в биомембраны лимфоцитов, обратимо увеличивая микровязкость липидного бислоя. Выявлено, что связывание ^3H -кукумариозида A_2 -2 с перитонеальными макрофагами характеризуется наличием двух мест связывания, а динамика связывания характеризуется двумя константами – высокоафинной ($Kd1 = 3.07 \text{ nM}$) и низкоафинной ($Kd2 = 489.6 \text{ nM}$) константами диссоциации. Установлено, что взаимодействие гликозида с перитонеальными макрофагами приводит к обратимому дозо-

зависимому изменению мембранного потенциала клеток и временной деполяризации. Этот эффект сопровождается резким увеличением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток. Быстрый вход Ca^{2+} в цитоплазму клеток является обратимым, амплитуда Ca^{2+} -сигнала пропорциональна концентрации гликозида, а поступление ионов кальция в клетки происходит из окружающей внешней среды, а не из внутриклеточных депо. Блокаторы потенциал-чувствительных кальциевых каналов верапамил, нифедипин и дилтиазем не блокировали увеличения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме так же, как и ингибитор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера амилорид. Применение блокатора G-белков гуанозин 5'-О-(2-тиодифосфата) приводило к полной блокировке входа кальция под действием кукумариозида A_2 -2 только при нефизиологической концентрации блокатора (порядка 1–10 mM) [47].

Методами радиоспектроскопии, MALDI-TOF-MS и MALDI имаджинга исследованы параметры фармакокинетического поведения кукумариозида A_2 -2 в гомогенате селезенки мышей и его пространственное распределение в ткани селезенки. Показано, что гликозид уверенно обнаруживается методом MALDI-TOF-MS в ткани селезенки мыши после однократной внутрибрюшинной инъекции в дозе 5 мг/кг. Установлено, что гликозид стабилен и практически не претерпевает метаболические превращения как в гомогенате ткани селезенки, так и в интактном органе через 24 час после инъекции. Гликозид быстро адсорбируется в органе и достигает максимальной концентрации (C_{max}) в течение 30 мин, а затем начинает выводиться в течение 3 час. Эти результаты совпадают с данными, полученными при исследовании фармакокинетики ^3H -кукумариозида A_2 -2. Методом MALDI имаджинга показано, что гликозид распределяется в основном в области серозной оболочки селезенки и не наблюдается внутри органа в области красной и белой пульпы. MALDI изображения срезов ткани селезенки, полученные через 15–30 мин после инъекции препарата, показывают, что препарат локализован в ткани в высокой концентрации и обнаруживается в регионах, окружающих орган, с последующим уменьшением его содержания и незначительным перераспределением во внутреннюю часть селезенки [48].

Таким образом, некоторые гликозиды голотурий и препараты на их основе показывают выраженный стимулирующий эффект на клеточный иммунитет в субтоксических наномолярных концентрациях, что открывает хорошие перспективы для их практического использования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Грант ДВО РАН № 12-I-П5-04, Гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-546.2012.4, а также Гранта РФФИ № 11-04-01084-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nigrelli R.F., Jakowska S. // Ann. New York Acad. Sci. 1960. V. 90. P. 884–892.
2. Lasley B.J., Nigrelli R.F. // Toxicon. 1970. V. 8, No. 4. P. 301–306.

3. Kalinin V.I., Volkova O.V., Likhatskaya G.N., Prokofieva N.G., Agafonova I.G., Anisimov M.M., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Stonik V.A. // J. Nat. Toxins. 1992. V. 1, No. 2. P. 17–30.
4. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Schentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A., Drozdova O.A., Stonik V.A. // Toxicon. 1996. V. 34. No. 4. P. 475–483.
5. Likhatskaya G.N., Kalinin V.I., Avilov S.A., Drozdova O.A., Anisimov M.M. // Abstr. 1st Euroconference on marine natural products. Athens – Greece. 2–6, November. 1997. P. 137.
6. Лихацкая Г.Н., Анисимов М.М., Калинин В.И., Авилов С.А., Дроздова О.А., Кольцова Е.А., Калиновская Н.И., Фролова Г.М. // Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии. Владивосток: Дальнаука. 1998. С. 38–39.
7. Shimada S. // Science. 1969. V. 163. P. 1462.
8. Батраков С.Г., Гиришвич Е.С., Дрожжина Н.С. // Антибиотики. 1980. № 6. С. 408–411.
9. Седов А.М. Характеристика иммуномодулирующих свойств тритерпеновых гликозидов голотурий. Автореф. канд. биол. наук. М.: 1984. 26 с.
10. Седов А.М., Елкина С.И., Сергеев В.В., Калина Н.Г., Саканделидзе О.Г., Батраков С.Г., Гиришвич Е.С. // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1984. № 5. С. 55–58.
11. Седов А.М., Шепелева И.Б., Захарова Н.С., Саканделидзе О.Г., Сергеев В.В., Мошашвили И.Я. // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1984. № 9. С. 100–104.
12. Седов А.М., Аполлонин А.В., Севастьянова Е.К., Козлова Н.Н., Стоник В.А., Авилов С.А., Купера Е.В. // Всес. совещ. «Биологически активные вещества при комплексной утилизации гидробионтов». Тез. докл. Владивосток. 1988. С. 70–72.
13. Седов А.М., Аполлонин А.В., Севастьянова Е.К., Алексеева И.А., Батраков С.Г., Саканделидзе О.Г., Лиходед В.Г., Стоник В.А., Авилов С.А., Купера Е.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1990. Т. 35, № 1. С. 23–26.
14. Седов А.М., Виноградов И.В., Жоголева И.Б., Николаева Е.Н., Борисенко Е.В., Севастьянова Е.К., Соколова Т.В., Стоник В.А., Саканделидзе О.Г. // Всесоюзный симпозиум «Реабилитация иммунной системы». Тез. докл. Цхалтубо. 1990. С. 354.
15. Соботович С.Л., Богуславский В.М. // Матер. 7 межд. конф. «Теоретические и клинические аспекты применения биорезонансной и мультирезонансной терапии». М.: 20–22 апреля, 2001. С. 98.
16. Гришин Ю.Н., Агафонова И.Г., Авилов С.А. // IX молодежная конф. по синтетическим и природным физиологически активным соединениям. Тез. докл. Ереван. 1988. С. 70.
17. Гришин Ю.И., Авилов С.А. // Научн. конф. «Экспериментальная и клиническая иммунология на Востоке страны». Тез. докл. Красноярск. 1988. Т. 1. С. 30.
18. Гришин Ю.И., Беседнова Н.Н., Стоник В.А., Ковалевская А.М., Авилов С.А. // Радиобиология. 1990. Т. 30, № 4. С. 556.
19. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. // Новости звероводства. 1991. № 2. С. 4.
20. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. // Новости звероводства. 1991. № 2. С. 19–23.
21. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Средство для профилактики и лечения алеутской болезни норки // Патент № 2036654, опубл. 09.09.1995. Бюл. № 16.
22. Любимова Н.Б., Леонова Г.Н., Мураткина С.М., Гришин Ю.Н. // Рабочее совещание «Иммуномодуляторы природного происхождения». Тез. докл. Владивосток. 9–10 октября, 1990. С. 62.
23. Grishin Y.I., Morozov E.A., Avilov S.A. // 8-th conference young scientists on organic and bioorganic chemistry. Latvia. Riga. 1991. P. 181.
24. Слугин В.С. Алеутская болезнь норки и пути ее ликвидации. Автореф. дисс....докт. вет. наук. М.: 1982. 343 с.
25. Шульгина Л.В., Блинов Ю.Г., Загородная Г.И., Сухотская Л.Ю., Тимчишина Г.Н., Усов В.В., Дугина В.М. Новые продукты для хирургических больных на основе гидролизата из кукумарии // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок. Сб. матер. Российской научн. конф. Владивосток: 24–25 июня. 1998. С. 188–192.
26. URL <http://www.tinro-center.ru/tinro-centr/struktura-tinro-centra> (доступно 21.10.2013).

27. Aminin D.L., Agafonova I.G., Berdyshev E.V., Isachenko E.G., Avilov S.A., Stonik V.A. // J. Med. Food. 2001. V. 4, No. 3. P. 127–135.
28. Agafonova I.G., Aminin D.L., Avilov S.A., Stonik V.A. // J. Agr. Food Chem. 2003. V. 51, No. 24. P. 6982–6986.
29. Aminin D.L., Agafonova I.G., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Woodward C. // J. Med. Food. 2008. V. 11, No. 3. P. 443–453.
30. Aminin D.L., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stepanov V.G., Kalinin V.I. // Nat. Prod. Com. 2010. V. 5, No. 12. P. 1877–1880.
31. Aminin D.L., Gorpenchenko T.Y., Bulgakov V.P., Andryjashchenko P.V., Avilov S.A., Kalinin V.I. // J. Med. Food. 2011. V. 14, No. 6. P. 594–600.
32. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., Aminin D.L., Kalinin V.I. // Nat. Prod. Res. 2013. V. 27, No. 19. P. 1776–1783.
33. Санина Н.М., Попов А.М., Лу И.А., Костецкий Э.Я., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. // Патент 2319506. опубл. 20.03.2008. Бюл. № 8.
34. Костецкий Э.Я., Попов А.М., Санина Н.М., Лу И.А., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. // Патент 2311926. опубл. 10.12.2007. Бюл. № 34.
35. Попов А.М., Лу И.А., Костецкий Э.Я., Санина Н.М., Цыбульский А.В., Шныров В.Л., Мазейка А.Н. // Патент 2322259. опубл. 20.04.2008. Бюл. № 11.
36. Лу И.А., Попов А.М., Цыбульский А.В., Санина Н.М., Костецкий Э.Я., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Мазейка А.В. // Прикл. биохим. и микробиол. 2008. Т. 44, № 6. С. 694–700.
37. Kostetsky E.Y., Sanina N.M., Mazeika A.N., Tsybulsky A.V., Vorobyeva N.S., Shnyrov V.L. // J. Nanobiotech. 2011. V. 9. P. 1–9.
38. Sanina N.M., Kostetsky E.Y., Shnyrov V.L., Tsybulsky A.V., Novikova O.D., Portniagina O.Y., Vorobieva N.S., Mazeika A.N., Bogdanov M.V. // Biochimie. 2012. V. 94, No. 4. P. 1048–1056.
39. Стоник В.А., Аминин Д.Л., Богуславский В.М., Авилов С.А., Агафонова И.Г., Сильченко А.С., Пономаренко Л.П., Прокофьева Н.Г., Чайкина Е.Л. // патент № 2271820, опубл. 20.03.2001. Бюл. № 8.
40. Aminin D.L., Pinegin B.V., Pichugina L.V., Zaporozhets T.S., Agafonova I.G., Boguslavski V.M., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. // Intern. Immunopharm. 2006. V. 6, No. 7. P. 1070–1082.
41. Aminin D.L., Chaykina E.L., Agafonova I.G., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. // Intern. Immunopharm. 2010. V. 10, 6. P. 648–654.
42. Гришин Ю.И., Авилов С.А. // Научн. конф. «Экспериментальная и клиническая иммунология на Востоке страны». Тез. докл. Красноярск. 1988. Т. 1. С. 30.
43. Гришин Ю.И., Агафонова И.Г., Авилов С.А. // IX молодежная конф. по синтетическим и природным физиологически активным соединениям. Тез. докл. Ереван. 1988а. С. 70.
44. Поверенный А.М. // Радиобиология. 1990. Т. 30, № 4. С. 538.
45. Aminin D.L., Zaporozhets T.S., Andryjashchenko P.V., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. // Nat. Prod. Com. 2011. V. 6, No. 5. P. 587–592.
46. Aminin D.L., Koy C., Dmitrenok P.S., Muller-Hilke B., Koczan D., Arbogast B., Silchenko A.A., Kalinin V.I., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Thiesen H.J., Deinzer M.L., Glocker M.O. // J. Proteom. 2009. V. 72, No. 5. P. 886–906.
47. Pisyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I., Kim N.Y., Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Avilov S.A., Aminin D.L. // Int. Immunopharm. 2012. V. 14. P. 1–8.
48. Pisyagin E.A., Dmitrenok P.S., Gorpenchenko T.Yu., Avilov S.A., Silchenko A.S., Aminin D.L. // Europ. J. Pharm. Sci. 2013. V. 49. P. 461–467.

БИМЕДИЦИНСКИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А. М. Попов^{1**}, О. Н. Кривошапко*, А. А. Артюков*, Э. П. Козловская*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159;

**Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток.

Биоактивные пептиды из морских организмов, как компоненты функциональных продуктов питания, могут содействовать сохранению здоровья человека, уменьшая риск развития хронических заболеваний. В настоящем обзоре приведены новые данные о биомедицинских свойствах пептидов, полученных из различных видов морских организмов, используя современные биотехнологии. На экспериментальных животных моделях человеческих патологий *in vivo* и при биотестировании *in vitro* было показано, что изучаемые пептиды, в частности пептиды из различных видов иглокожих, обладают широким спектром медико-биологической активности. Определено, что размер активных последовательностей указанных пептидов может варьировать от трех до двадцати аминокислот. На основании сравнительного анализа активности пептидных препаратов из морских организмов с биоактивными пептидами, полученными из других природных источников, рассмотрены возможные механизмы их биологического действия.

Ключевые слова: морские лекарства; биоактивные пептиды; морские организмы; фармакологическая активность.

Biomedical properties of peptides from marine organisms and prospects of use.

A. M. Popov^{1**}, O. N. Krivoshapko*, A. A. Artyukov*, E. P. Kozlovskaya* (*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, Russia. **Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia)

Bioactive peptides from marine organisms as components of functional foods can contribute to the preservation of human health by reducing the risk of chronic diseases. This survey provides new data on biomedical properties of peptides derived from various species of marine organisms using modern biotechnology. In experimental animal models of human pathologies *in vivo* and *in vitro* tests, these marine peptides, particularly the peptides from different types of echinoderms were shown to possess a broad spectrum of medical and biological activity. It was determined that the size of the active sequence of the peptides may vary from three to twenty amino acids. From comparative analysis of the activity of the peptide preparations from marine organisms with that of bioactive peptides derived from other natural sources, the possible mechanisms of their biological action may be suggested

Keywords: marine drugs; bioactive peptides; marine organisms; pharmacological activity.

¹ Автор для связи (+7 (495) 231-16-61; эл. почта: popovam@piboc.dvo.ru).

Сокращения: БАВ – биологически активные вещества; БАД – биологически активные добавки; АПФ – ангиотензин-I-превращающий фермент; ПК – пептиды коллагена; ПКИ – пептиды коллагена иглокожих; ПКЗ – пептиды коллагена морской звезды; ПКК – пептиды коллагена кукумарии; ПКГ – пептиды коллагена голотурии (ПКТ – пептиды коллагена трепанга); ПКЕп – пептиды коллагена плоского морского ежа; ПКЕи – пептиды коллагена игольчатого морского ежа.

Морские организмы являются богатым источником биоактивных соединений, которые можно отнести к категории биологически активных добавок (БАД), включающих как нутрицевтики, так и парафармацевтики [1-5]. В последнее время особое внимание привлекают функционально активные пептиды, выделенные из морского сырья, поскольку они проявляют медико-биологические свойства. Биоактивные пептиды из ценных морепродуктов в виде белковых гидролизатов имеют положительное корректирующее влияние на функции организма при экспериментальном моделировании различных патологий и могут быть полезны для здоровья человека [3-7].

В качестве примера можно привести безалкогольные бальзамы серии «Гербамарин». Так, в состав бальзама «Гербамарин-сердечно-сосудистый», предназначенного, прежде всего, для больных гипертонией и ожирением, входят биологически активные вещества (БАВ) лекарственных растений и пептиды морских беспозвоночных, действие которых преимущественно направлено на рецепторы-мишени, расположенные в сердечно-сосудистой и центральной нервной системе. В бальзаме «Гербамарин-печеночный» представлен широкий спектр антиоксидантов, полипептидов морского генеза, витаминов и других БАВ растительного и животного происхождения, которые необходимы для коррекции печеночных патологий и нормализации функционирования печени. Эти бальзамы разработаны в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, прошли необходимые клинические испытания в Институте питания РАМН и выпускаются с соблюдением правил «GMP» уже около 20-ти лет [5-7].

Энзиматический гидролиз пищевых белков представляет собой один из самых быстрых и воспроизводимых методов получения биоактивных пептидов, которые могут стать и становятся полезными для здоровья пищевыми ингредиентами [3]. Так, многочисленные пептиды, полученные путем ферментативного гидролиза из различных видов рыб, а именно: лососевых [8, 9], трески [10], желтого полосатого каранга [11] и желтоплавниковой камбалы [12, 13], обладают разнообразной медико-биологической активностью. Однако, несмотря на успехи, достигнутые в изучении этих биологически активных пептидов, клинический арсенал фармакологических средств на их основе все еще крайне мал. Поэтому ведется активный поиск новых эффективных пептидов из разных видов морепродуктов [11-13].

В последнее время некоторые активные пептиды были выделены из субпродуктов морских организмов и их отходов [12-14]. Отходы морского сырья (кожа рыб, кости, чешуя и остатки мяса на костях) обычно вызывают загрязнения окружающей среды, но, используя современные технологии, могут быть превращены в функциональную белковую пищу [15-16]. Субпродукты образуются в процессе приготовления пищи и пока имеют небольшое коммерческое значение. Однако обнаружение у них полезных медико-биологических свойств, например, ингибирующей активности в отношении ангиотензин-І-превращающего фермента (АПФ), возможно, в ближайшем будущем значительно уменьшит количество отходов и увеличит их коммерческую ценность. Для биоактивных пептидов, полученных из отходов различных морских организмов, уже сейчас отмечен широкий спектр медико-биологического действия, включая антигипертензивный эффект или ингибирование АПФ, антиоксидантную, антикоагулянтную, гипохолестеринемическую и другие активности [2, 12-14].

В ТИБОХ ДВО РАН разработаны и запатентованы технологии получения пептидов коллагена (ПК) из морских организмов с использованием комплекса про-

теолитических ферментов «Коллагеназа КК» из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica*. При этом нами впервые было проведено комплексное тестирование фармакологических свойств ПК из морских иглокожих, а именно: морской звезды *Patiria pectinifera* (ПКЗ), кукумарии *Cucumaria japonica* (ПКК), дальневосточной голотурии (трепанг) *Apostichopus japonicus* (ПКТ), плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (ПКЕп) и игольчатого морского ежа *Strongylocentrotus nudus* (ПКЕи) с использованием экспериментальных моделей патологий человека как *in vivo*, так и *in vitro*, и определены возможные перспективы разработки на их основе новых компонентов функционального питания, а также лечебно-профилактических и парафармацевтических средств [14, 17, 18]. Сравнительный анализ аминокислотного состава этих пептидов свидетельствует о том, что они являются фрагментами коллагена. При этом особенности состава и последовательность аминокислот в этих ПК, как и в других биоактивных коллагенах, очевидно, определяют спектр и эффективность их фармакологического действия [4, 14, 17, 18].

Противоопухолевая активность пептидов из морских организмов. Опухолевые заболевания – острейшая проблема современного здравоохранения, поскольку являются одной из основных причин смертности в мире, а лечение рака в настоящее время очень дорогостоящее и сравнительно малоэффективное. В то же время считается, что до 40% случаев заболеваний раком можно предотвратить с помощью здорового рациона питания, содержащего природные канцерпревентивные и противоопухолевые средства (биофлавоноиды, антиоксиданты, биоактивные пептиды и другие природные компоненты пищи) [18-20].

В этом контексте продукты ферментативной трансформации коллагенов уже давно привлекают внимание исследователей значительной противоопухолевой активностью. Так, установлено, что длительное воздействие эндостатина, С-концевого фрагмента коллагена XVIII человека, вызывает апоптоз эндотелиальных клеток и ингибирует рост кровеносных сосудов, питающих опухоль и создающих условия для метастазирования ее клеток [21, 22].

Недавно, используя комплекс протеолитических ферментов «Коллагеназа КК» из гепатопанкреаса камчатского краба *P. camtschatica* («Иммунопрепарат», Россия), нам удалось получить пептиды коллагена голотурии (трепанга) (ПКТ) *A. japonicus*. Этот препарат обладал умеренной противоопухолевой активностью, заметно ингибируя рост солидного варианта аденокарциномы Эрлиха *in vivo* [14]. Следует сказать, что трепанг широко использовался и используется в настоящее время населением Азиатско-Тихоокеанского региона как деликатесный пищевой продукт и применяется в медицине в качестве лечебно-профилактического средства при различных заболеваниях, особенно при лечении онкопатологий [23].

С целью поиска новых источников противоопухолевых препаратов мы провели оценку уровня противоопухолевой активности пептидов коллагена, полученных из других видов иглокожих, в частности морской звезды (ПКЗ). Тестирование противоопухолевой активности ПКЗ в отношении солидного варианта опухоли Эрлиха проводили в интервале доз от 2.5 до 10 мг/кг в сравнении с нелечеными животными и лечеными известным противоопухолевым препаратом циклофосфаном, соединением нуклеофильной природы. ПКЗ обладал выраженной дозо-зависимой противоопухолевой активностью. Наибольший эффект наблюдался в дозе 5 мг/кг ($56.75 \pm 17.65\%$) при пятикратном ежедневном введении, начиная со следующего дня после инокуляции

опухоли. Монотерапия циклофосфаном давала противоопухолевый эффект равный $40 \pm 14.55\%$. Комбинированное применение ПКЗ (5 мг/кг) и циклофосфана показало, что эти соединения при данной схеме применения не обладают синергетическим действием ($44.51 \pm 8.59\%$). Полученные данные позволяют предположить наличие сходства в механизме ингибирования опухолевого роста ПКЗ, ПКТ и эндостатина. Таким образом, ПКЗ и ПКТ могут быть рекомендованы как потенциальные нетоксичные средства дополнительной терапии при онкологических заболеваниях [17, 18].

Антикоагулянтная активность пептидов из морских организмов. Гемостаз – сложный многоступенчатый процесс, основная роль которого – сохранение жидкого состояния крови и предупреждение кровопотери при повреждении сосудов. Формирование гемостатического потенциала определяется активностью и характером взаимодействия плазменных и тромбоцитарных факторов свертывания крови. Нормальный гемостаз обеспечивается равновесием между постоянно осуществляемой с высокой интенсивностью активацией факторов свертывания крови и их ингибиторов и функционированием фибринолитической системы. Однако при напряжении гемостаза (травмы, инфекционные процессы и т.д.), свертывающий потенциал крови преобладает над антикоагулянтным, антитромбоцитарным и фибринолитическим, что может привести к закупорке просвета сосуда гемостатическим тромбом. Для предотвращения этого явления широко применяются прямые антикоагулянты и антиагреганты, арсенал которых в настоящее время недостаточен [17, 18].

В медицинской практике для предотвращения тромбоэмболических осложнений широкое применение в качестве антикоагулянтного и антитромбогенного средства получили гепарин – полисахарид животного происхождения с высокой степенью сульфатирования, и герудин – комплекс пептидов из слюны пиявок. Однако эти препараты имеют ряд ограничений и побочных эффектов, таких как возникновение зависимости от препарата, проявление аллергии и тромбоцитопении [24]. Следует отметить, что коллаген и отдельные его фрагменты способны воздействовать на разные звенья системы свертывания крови, оказывая противоположные эффекты в зависимости от строения [25, 26].

В серии экспериментов *in vitro* нами была произведена оценка влияния препаратов ПКЗ и ПКК на систему коагуляционного гемостаза по следующим показателям: влияние на начальный этап свертывания крови в тестах определения протромбинового времени и активированного парциального тромбопластинового времени. Определение протромбинового времени ПКК и ПКЗ показало, что в малых концентрациях (0.1 и 0.3 мг/мл) они оказывают прокоагулянтное действие, при достаточно высоких (1.5 – 4.0 мг/мл) концентрациях они проявляют антикоагулянтную активность. Это указывает на то, что ПКК и ПКЗ оказывают воздействие на начальное звено системы свертывания крови, запускаемое по внешнему пути [17, 18].

В тесте определения активированного парциального тромбопластинового времени исследуемые пептиды коллагенов иглокожих (ПКИ) проявляли достаточно сильное антикоагулянтное действие. Уже в дозе 0.1 и 0.3 мг/мл ПКЗ увеличивал время образования сгустка в 1.5-2 раза, а ПКК в дозе 0.1 мг/мл – в 3.6 раз. По-видимому, пептиды коллагенов иглокожих действуют как антикоагулянты на внутренний путь активации свертывания крови. Следовательно, ПКК и ПКЗ проявляют сходство в антикоагулянтной активности *in vitro* с ПКТ. Возникает вопрос – сохраняют ли эти морские ПК

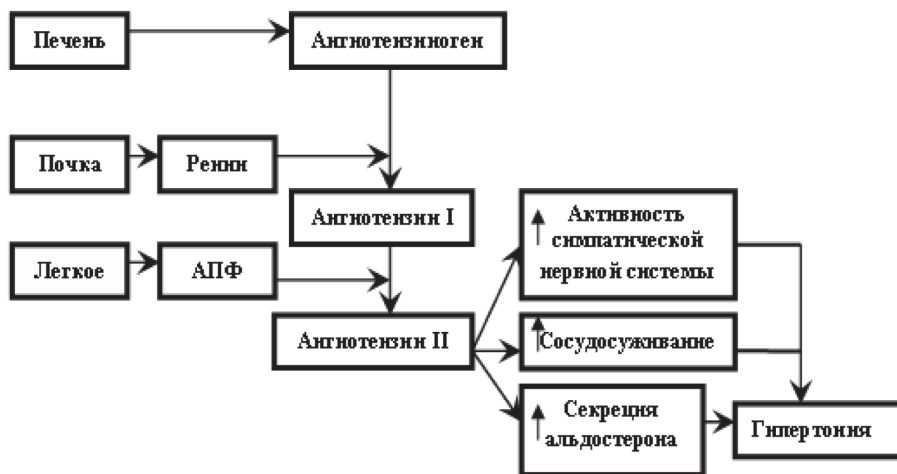
свои антикоагулянтные свойства в экспериментах *in vivo* при пероральном маршруте введения? Как оказалось, действие ПКТ на свертываемость крови при введении *per os* зависит от вводимой концентрации и времени экспозиции. При введении ПКТ в дозах от 25 до 200 мг/кг наблюдается быстрое всасывание этого препарата в кровь экспериментальных животных. Расчетный индекс антикоагулянтной активности ПКТ (отношение времени коагуляции крови в опытных пробах к контрольным) вводимых *per os* дозах 50 и 100 мг/кг составляет примерно 1.5 и 2.0 соответственно. Следует отметить, что антикоагулянтная активность ПКТ при внутрибрюшинном и внутримышечном способе введения является более выраженной, чем при введении *per os* [17, 18].

Таким образом, при оценке действия ПК из морских организмов на гемостаз крови было показано, что ПКТ, ПКЗ и ПКТ проявляют умеренную антикоагулянтную активность. Их добавление к нестабилизированной крови мышей увеличивало время ее свертывания, а также время свертываемости тромбоцитарной плазмы человека при добавлении тканевого тромбопластина – естественного инициатора свертывания крови по внешнему механизму. Проявление их антикоагулянтного действия в тесте определения протромбинового времени было дозозависимым. Они блокировали конечный этап свертывания крови, а именно образование сгустка в тромботесте, останавливая процесс превращения фибриногена в фибрин путем влияния на активность тромбина в ферментативной фазе свертывания крови. Однако, в целом, эти пептиды обладали гораздо более слабой антикоагулянтной активностью по сравнению с гепарином и имели отличия в механизме действия на систему коагуляционного звена гемостаза. Действие этих ПК на свертываемость крови при введении *per os* зависит от вводимой концентрации и времени экспозиции. Этот факт говорит о том, что при прохождении пептидов через систему желудочно-кишечного тракта они не подвергаются дальнейшей ферментативной деградации и сохраняют свои антикоагулянтные свойства, что очень важно для потенциальных компонентов функционального питания [4, 17, 18].

Ингибирующая активность пептидов из морских организмов в отношении протеолитических ферментов: АПФ и коллагеназы. Повышенное давление – всемирная проблема, носящая эпидемический характер и охватывающая до 15-20% взрослого населения нашей планеты. Эта патология несет серьезный риск заболевания атеросклерозом, инсультом, инфарктом миокарда и конечной стадии болезни почек. Ключевым ферментом в регуляции периферического кровяного давления является АПФ – пептидилдипептидгидролаза, ЕС 3.4.15.1. АПФ превращает ангиотензин-I в ангиотензин-II, белковую молекулу, обладающую очень сильным сосудосуживающим действием, что играет очень важную роль в регулировании кровяного давления (рисунок). В связи с этим ингибиторы АПФ широко используются для лечения постоянной гипертензии и сердечной недостаточности [4, 26].

В настоящее время получено большое количество пептидов, ингибирующих АПФ, из различных пищевых белков: сырной сыворотки [27], молока [28, 29], зерен сои и кукурузы [30, 31], рыб [32, 33], моллюсков [34], клейковины [35], а также из плазмы крови быка [36]. Кроме того, ингибиторы АПФ были выделены из некоторых образцов ферментированной пищи, например, из соевого соуса [37–40]. В частности, пептиды молока – казокинины и лактокинины, представляют собой группу ПК, которые ингибируют АПФ и имеют значительный потенциал для профилактики и контроля кровяного давления и связанных с ним болезней.

Некоторые эндогенные пептиды, такие как энкефалины, брадикинин и субстанция Р, являются ингибиторами и конкурентными субстратами для АПФ. Например, в кинин-каликрииновой системе АПФ активирует брадикинин, сосудорасширяющую молекулу. В связи с этим этот фермент играет ключевую роль в регуляции локальных уровней определенных эндогенных биоактивных пептидов (рисунок).



Ренин-ангиотензин-альдостероновая система

Существующие взаимоотношения между структурой и активностью разных пептидов, ингибирующих активность АПФ, показывают, что связывание с АПФ находится под строгим влиянием С-терминальной трипептидной последовательности субстрата, хотя точная субстратная специфичность до конца не понятна. Субстраты или конкурентные ингибиторы АПФ, по-видимому, содержат в каждом из трех С-терминальных положений преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки. Исследование ингибирования АПФ дипептидами с разной структурой показывает, что С-терминальный триптофан, тирозин, фенилаланин или пролин были наиболее эффективными аминокислотными остатками, которые увеличивали связывание ингибитора с АПФ. Следует отметить, что все казокинины, то есть пептиды, ингибирующие АПФ, выделенные из казеина, имеют в С-терминальном остатке пролин, лизин или аргинин [4, 26].

Во время перорального введения пептидов и гидролизатов, обладающих ингибирующей активностью в отношении АПФ, резистентность к деградации пептидазами – основное предварительное условие для их антигипертензивного действия. Пептиды, содержащие пролин (Pro), в целом, резистентны к деградации пищеварительными ферментами, более того, трипептиды, содержащие С-концевой Pro-Pro, резистентны к Pro-специфическим пептидазам. Интересно, что трипептический пептид β-лактоглобулин f(142-148) резистентен к дальнейшей деградации трипсином и хемотрипсином. С другой стороны, деградация и фрагментация пептидов может приводить к более сильной ингибирующей активности в отношении АПФ. Например, удаление С-терминального глутамина из β-казеина f(169-175) увеличивает *in vitro* ингибирующий эффект в отношении АПФ от 1000 до 5 мкмоль/л.

Большинство исследованных пептидов не обладают АПФ-ингибирующей активностью, сравнимой с активностью каптоприла ($IC_{50} = 0.006$ мкмоль/л). Однако, поскольку эти пептиды получены из природных продуктов, они не имеют побочных эффектов, которые сопровождают действие синтетических лекарственных средств, используемых в терапии для контроля повышенного давления. Это, прежде всего, кашель и изменение липидного метаболизма в плазме крови [4, 17, 18, 26].

АПФ – это фермент, ингибиторы которого, как правило, содержат концевой пролин или его производные [26]. Поэтому пептиды, содержащие значительные количества пролина и оксипролина, как правило, являются его естественными ингибиторами. Интересно, что по данным аминокислотного анализа ПККИ содержат значительное количество пролина и оксипролина [17, 18]. Учитывая эту информацию, вполне логичным было предположить, что ПККИ способны ингибировать активность АПФ и, возможно, коллагеназы (эндопептидаза, металлопротеиназа [Zn^{2+}], КФ 3.4.24.7), конечным продуктом ферментализации которой они являются.

В серии экспериментов было исследовано три экспериментальных образца ПК иглокожих: ПКЗ, ПКК и ПКЕ. Было показано, что их действие на АПФ является дозозависимым. Наибольшую ингибирующую активность в дозе 300 мкг/мл проявляет ПКЗ (около 60%), который, как говорилось выше, отличается высоким содержанием пролина и оксипролина. ПКК в указанной дозе также показывают достаточно высокий ингибирующий эффект (40%), наименьшую активность проявляют ПКЕ (14%). Очевидно, что в дальнейшем в качестве активных компонентов функциональных продуктов питания, предназначенных для лиц с повышенным артериальным давлением, можно будет использовать ПКЗ.

Исследование ингибирующей активности ПККИ в отношении коллагеназы показало наличие дозозависимого действия для всех исследуемых пептидов иглокожих (ПКЗ – 80.3%, ПКК -1% и ПКЕ – 67% в дозе 300 мкг/мл) [17, 18].

Следует отметить тот факт, что все три препарата ПККИ, судя по результатам хромато-масс-спектрометрического анализа, содержат высокополимерные и среднеполимерные пептиды, которые, по данным кругового дихроизма, сохраняют третичную структуру нативного коллагена. Можно предположить, что именно эти компоненты ПККИ являются ингибиторами АПФ и коллагеназ [16–18].

Таким образом, пептиды коллагенов, полученные по оригинальной технологии из различных видов иглокожих, обладают широким спектром фармакологического действия. Они нетоксичны, безопасны при длительном применении и обладают положительными органолептическими свойствами. После проведения доклинических испытаний они могут быть рекомендованы для применения в качестве основных активных компонентов при разработке новых БАД-парафармацевтиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korhonen H., Pihlanto A. // *Curr. Pharm. Des.* 2003. V. 9. P. 1297–1308.
2. Weathington N.M., van Houwelingen A.H., Noerager B.D., Jackson P.L., Kraneveld A.D., Galin F.S., Folkerts G., Nijkamp F.P., Blalock J.E. // *Nat. Med.* 2006. V. 12, No. 3. P. 317–323.
3. Lordan S., Ross R.P., Stanton C. // *Mar. Drugs.* 2011. V. 9. P. 1056–1100.
4. Meisel H. // *Curr. Pharm. Des.* 2007. V. 13. P. 873–874.
5. Попов А.М., Попов Е.А. // Вторичные метаболиты морских беспозвоночных и наземных растений: биологическая активность и механизмы действия / Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. 2012. С. 307–321.

6. Попов А.М., Бурцева Т.И., Семенова Н.В., Ли И.А., Козловская Э.П. // Биомедиц. химия. 2003. Т. 49, № 4. С. 394–400.
7. Бурцева Т.И., Попов А.М., Семенова Н.В., Ли И.А., Козловская Э.П. // Биомедиц. хим. 2005. Т. 51, № 2. С. 192–198.
8. Liaset B., Julsham, K., Espe M. // Process Biochem. 2003. V. 38. P. 1747–1159.
9. Zhang Z., Zhao M., Wang J., Ding Y., Dai X., Li Y. // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 696–711.
10. Gildberg A., Arnesen J.A., Carlehog M. // Process Biochem. 2002. V. 38. P. 475–480.
11. Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F. // Food Chem. 2007. V. 102. P. 1317–1327.
12. Ngo D.H., Vo T.S., Ngo D.N., Wijesekara I., Kim S.K. // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 51, No. 4. P. 378–383.
13. Yang R., Wang J., Liu Z., Pei X., Han X., Li Y. // Mar. Drugs. 2011. V. 9. P. 2304–2315.
14. Попов А.М., Артюков А.А., Кривошапко О.Н., Штода Ю.П., Руцкова Т.А., Глазунов В.П., Козловская Э.П. // Биофарм. журн. 2012. Т. 5. С. 5–16.14
15. Jung W.K., Mendis E., Je J.Y., Park P.J., Son B.W., Kim H.C., Choib Y.K., Kim S.K. // Food Chem. 2006. V. 94. P. 26–32.
16. Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G., Nam K.S., Joo D.S., Shahidi F. // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 2992–2997.
17. Popov A.M., Artyukov A.A., Krivoshapko O.N., Kozlovskaya E.P. // American J. Biomed. Life Sci. 2013. V. 1, No. 1. P. 17–26.
18. Popov A.M., Artyukov A.A., Glazunov V.P., Mandron E.V., Krivoshapko O.N., Kozlovskaya E.P. // Russian Journal of Marine Biology. 2011. V. 37, No. 3. P. 217–222.
19. Krivoshapko O.N., Popov A.M., Artyukov A.A., Kostetsky E.Y. // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry. 2011. V. 5, No. 2. P. 152–157.
20. Кривошапко О.Н., Попов А.М. // Вопросы питания. 2011. № 2. С. 4–8.
21. Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M.S. // Nature. 1997. V. 390. P. 404–407.
22. Karamouzis M.V., Moschos S.J. // Expert Opin. Biol. Ther. 2009. V. 9. P. 641–648.
23. Савватеева Л.Ю., Маслова М.Г., Володарский В.Л. // Дальневосточные голотурии и асцидии как ценное пищевое сырье / Владивосток: Изд-во ДВГУ. 1983. С. 8–45.
24. Warkentin T.E. // Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2004. V. 17. P. 105–125.
25. Maruyama S., Nonaka I., Tonaka H. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1164. P. 215–218.
26. FitzGerald R.J., Meisel H. // Br. J. Nutr. 2000. V. 84. P. 33–37.
27. Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoch T. // J. Dairy Sci. 1998. V. 81. P. 3131–3138.
28. Maruyama S., Mitachi H., Awaya J., Kurono M., Tomizuka N., Suzuki H. // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. P. 2107–2114.
29. Maeno M., Yamamoto N., Takano T. // J. Dairy Sci. 1996. V. 79. P. 1316–1321.
30. Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Fukui F., Tanaka H., Maruyama S. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. P. 1313–1318.
31. Yano, S., Suzuki, K., Funatsu, G. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1996. V. 60. P. 661–663.
32. Kohama Y., Matsumoto S., Oka H., Teramoto T., Okabe M., Mimura T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. V. 155. P. 332–337.
33. Ukeda H., Matsuda H., Osajima K., Matsufuji H., Matsui T., Osajima Y. // Nippon Nogeikagaku Kaishii. 1992. V. 66. P. 25–29.
34. Je J.Y., Park P.J., Byun H.G., Jung W.K., Kim S.K. // Bioresour Technol. 2005. V. 96, No. 14. P. 1624–1629.
35. Suh H.J., Whang J.H. // Biotechnol. Lett. 1999. V. 21. P. 1055–1058.
36. Hyun C.K., Shin H.K. // Process Biochem. 2000. V. 36. P. 65–71.
37. Kinoshita E., Yamakoshi J., Ikuchi M. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993. V. 57. P. 1107–1110.
38. Okamoto A., Hanagata H., Kawamura Y., Yanagida F. // Plant Foods Hum. Nutr. 1995. V. 47. P. 39–47.
39. Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3898–3904.
40. Wijesekara I., Kim S.-K. // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 1080–1093.

СОЗДАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ МРТ

И. Г. Агафонова¹

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.*

В Тихоокеанском институте биоорганической химии имеется большой арсенал высокоточной диагностической техники, которая позволяет ученым быстро и качественно получать необходимую информацию о физиологическом действии изучаемых веществ. К таким приборам относится и сверхпроводящий ЯМР-томограф, предназначенный для фармакологических исследований препаратов широкого спектра действия на лабораторных животных весом до 350 грамм. На протяжении последних лет нами было создано несколько моделей заболеваний у мышей для изучения влияния препаратов *in vivo*. Высокоточная техника позволяет в динамике, неинвазивно, на малом количестве животных получить нужную информацию по действию тестируемого вещества внутри живого организма.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография; индукция заболеваний; неврология; ангиография; ангиогенез.

The creation of experimental animal models. Studying of physiological activity of compounds with MRI. I.G. Agafonova¹ (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Vladivostok, Russia)

The Pacific Institute of Bioorganic Chemistry has a broad arsenal of high-precision diagnostic equipment, which allows to scientists quickly and qualitatively to receive necessary information on studied substance comparable with the international standards. One of them is the superconducting Nuclear Magnetic Resonance tomography, which was constructed for pharmacological studies of many compounds of widely range of action for laboratory animals up to 350 grams of weigh. Some models of diseases at mice and rats for studying individual effect of connection with estimated activity were created during the last years. The high-precision equipment allows receiving the necessary information on substance action in a live animal in dynamics, noninvasively, with small quantity of animals.

Keywords: magnetic resonance imaging; induction of diseases; neurology; angiography; angiogenesis.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитно-резонансная томография – это специальный метод получения диагностических изображений, который основан на явлении ядерно-магнитного резонанса.

¹ Адрес для связи (+7 (423) 231-99-32; эл. почта: agafonova@piboc.dvo.ru).

В этом методе не используются зараженные радиоактивные вещества, либо иные потенциально опасные для здоровья излучения.

Тело человека само по себе излучает слабые радиосигналы, именно поэтому главной задачей МРТ является создать такие условия, при которых человек станет этим «излучателем». Аппарат изолирует пациента от внешних радиосигналов, чтобы максимально оградить его от внешних помех, собственное излучение тела человека является индикатором правильности работы организма.

Когда пациент помещен в аппарат МРТ, в дело вступает очень сильное, но безвредное для организма магнитное поле. С помощью магнитного поля возбуждаются радиосигналы, излучаемые различными органами только из определенной области тела. Радиосигналы улавливаются сверхчувствительными датчиками, которые отправляют их на обработку в АЦП, который преобразует радиосигналы в изображение. Оно отражается на мониторе компьютера и впоследствии расшифровывается врачом-диагностом. Это изображение называется томограммой.

Ткани и органы одного типа имеют приблизительно одинаковый уровень сигнала и отображаются как целые органы или системы органов. Любые аномальные клетки (опухоли, кисты или другие повреждения) дают другой уровень сигнала и, соответственно, имеют на томограмме либо другой цвет, либо другую структуру. Врач-диагност просматривает сделанные снимки и определяет, какая именно патология у пациента, и выбирает метод лечения. Процедура МРТ проходит абсолютно безболезненно для пациента.

Техника МРТ используется не только для диагностики заболеваний, но и для изучения фармакологических свойств медицинских препаратов и веществ, изучаемых в качестве потенциальных лекарственных субстанций. Для этих целей применяются томографы, предназначенные для фармакологических испытаний на животных. Они имеют более мощные магниты, чем диагностические томографы, хотя и не отличаются принципом действия (рис. 1).

Ученые ТИБОХ ДВО РАН за долгие годы выделили и синтезировали значительное количество природных соединений. Изучение фармакологического действия наиболее перспективных из них требует применения новых, современных средств и методов на ранних стадиях отбора препаратов для дальнейшего изучения.

Важным моментом в изучении фармакологических препаратов является выбор модели заболевания, способов его индукции у экспериментальных животных и оценка результатов применения этих моделей в фармакологических исследованиях. Лабораторные животные, особенно крысы с их агрессивным иммунитетом, как правило, не подвергаются заболеваниям, сходным с человеческими болезнями. Существуют специальные исследовательские центры по индукции таких заболеваний у лабораторных животных. Другие исследовательские центры специализируются на выведении линий животных, имеющих патологии, сходные с человеческими.

На базе института, в условиях лаборатории и вспомогательного помещения – vivария, было создано несколько экспериментальных моделей заболеваний у животных для поиска потенциальных источников новых лекарств. В данном обзоре представлена лишь часть индуцированных нами модельных заболеваний лабораторных животных, и некоторые результаты применения этих моделей в конкретных исследованиях.



Рис. 1. Магнитно-резонансный томограф “PharmaScan US 70/16” (Фармаскан); выпущен фирмой Bruker (Германия); состоит из сверхпроводящего магнита мощностью 7 Тесла и частотой процессора 300 MHz, операционного модуля “Avance”, рабочей станции и программного обеспечения *ParaVision 5.1*. а – консоль, б – операционный модуль, в – томограф, г – животное под анестезией

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Поиск биологически активных веществ природного и синтетического происхождения, обладающих противоопухолевой активностью

Современная медицина насчитывает более двухсот разновидностей онкологических патологий. Проблемы ранней диагностики и своевременного лечения онкологических заболеваний являются весьма актуальными. Высокая опасность злокачественных опухолей для жизни человека связана с высокой скоростью роста раковых клеток и образованием метастазов – новых очагов болезней.

Традиционно в институте, и, в частности, в лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ уже более 30 лет ведется поиск новых противоопухолевых соединений. Источниками этих веществ являются морские

и наземные растения и морские животные. Для их испытания в арсенале института имеется несколько экспериментальных моделей опухолевых клеток, культивируемых *in vivo* и *in vitro*.

В частности, на мышинной солидной карциноме Эрлиха был изучен противоопухолевый и превентивный эффекты 3-метилубихинона Q2 в экспериментах *in vivo*. Показано, что тестируемое вещество в концентрации 30 мг/кг при пятикратном введении показывает ингибирующий эффект в отношении роста данной опухоли [1].

В 2007 г. была изучена динамика ингибирования роста солидной карциномы Эрлиха под действием тиакарпина, синтетического аналога алкалоида, ранее выделенного из морской асцидии *Polyscarpa aurata*. С помощью томографии были подобраны схема терапии и способы введения препарата. В результате исследования было показано, что данный препарат обладает противоопухолевым эффектом.

Преимущество томографии перед другими методами состоит в том, что на протяжении одного эксперимента можно исследовать эффект препарата в динамике, на живых индивидуальных лабораторных животных, причем одновременно оценивается и побочный эффект препарата на другие органы [2].

Артериальная гипертензия

Магнитно резонансная томография дает широкую возможность изучать различные изменения кровеносных (артериальных, венозных, лимфатических) сосудов различных органов животных с использованием контрастных веществ. Ангиография позволяет выполнять объемное изображение и 3D-реконструкцию сосудов. С применением ангиографии церебральных и магистральных сосудов нами было использовано несколько экспериментальных моделей заболеваний мышей и крыс, таких как индуцированная артериальная гипертензия (АГ), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), атеросклероз, гиперхолестеринемия, атеросклероз.

Изучение циркуляторного гомеостаза у крыс с экспериментальной артериальной гипертензией (АГ) показало, что АГ вызывает нарушение вазомоторной функции сосудов церебрального бассейна, характеризующееся дисбалансом между депрессорными и прессорными эндотелийзависимыми реакциями с заметным преобладанием констрикции (сужение сосудов).

Развитие АГ у крыс линии Вистар модулирует усиление адренергической активности вегетативной нервной системы. С помощью МРТ показано, что физиологическая устойчивость вазомоторной функции эндотелия церебральных артерий в условиях артериальной гипертензии нарушена.

По результатам исследования был опубликован ряд работ совместно с сотрудниками Владивостокского государственного медицинского университета, которые создали модель АГ у животных [3–6].

Мониторинг показателей структурно-функционального повреждения сосудов при экспериментальном атеросклерозе

Крысам линии Вистар была индуцирована модель экспериментального атеросклероза путем нефрэктомии левой почки с дополнительной холестериновой диетой. Была выполнена оценка состояния магистральных (аорта) и церебральных (передние,

средние и задние мозговые артерии) сосудов методом ангиографии. Было установлено, что на втором месяце исследования у опытных крыс ширина общей сонной артерии, плечеголового ствола, грудной части аорты, увеличивались (рис. 2). Данная сосудистая реакция обусловлена включением защитно-приспособительных механизмов для поддержания центральной гемодинамики. К шестому месяцу эксперимента отмечалось сужение просвета перечисленных сосудов, регистрировалось уменьшение ширины просвета подвздошных и бедренных артерий, что свидетельствует о мультифокальности поражения артериального русла при комплексном действии гиперлипидемии и артериальной гипертензии [7].

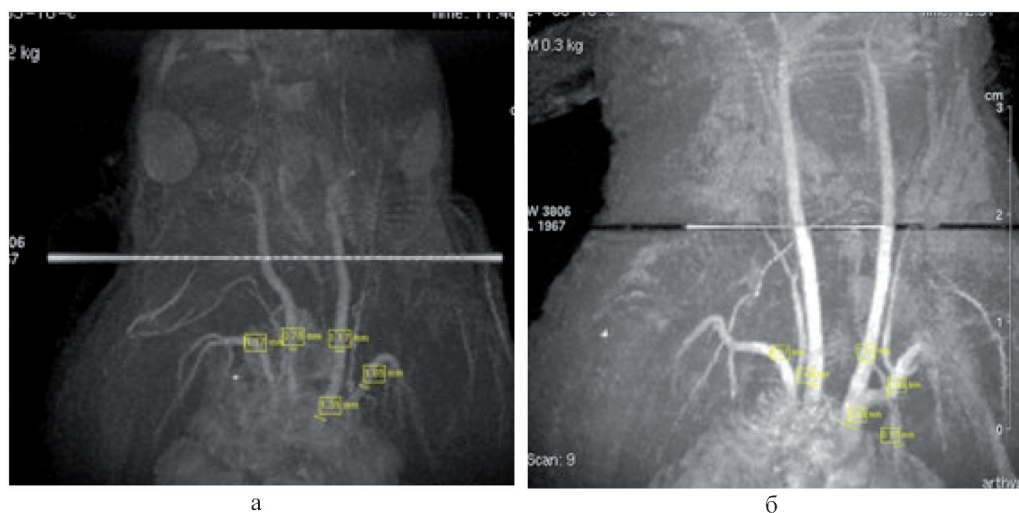


Рис. 2. Изменение размеров аорты: а – в контроле; б – в эксперименте. Морфометрические измерения структурно-функциональных повреждений сосудов при экспериментальном атеросклерозе

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

В связи с несомненной доказанностью роли хронического табакокурения в этиопатогенезе ХОБЛ у человека, для моделирования эндотелиальной дисфункции сосудистого русла была воспроизведена *in vivo* экспериментальная модель ХОБЛ путем вдыхания табачного дыма у крыс. В качестве вазодилаторов использовали ацетилхолин (0.7 мг/кг внутривентриально) и раствор нитроглицерина (0.025 мг/кг субингвально), в качестве вазоконстрикторов – L-аргинин (1.0 мг/кг внутривентриально) и норадреналин (0.2 мг/кг внутривентриально). Эндотелиозависимая вазодилатация (ЭЗВД) была исследована на введение ацетилхолина, эндотелионезависимая вазодилатация (ЭНЗВД) – на введение нитроглицерина, эндотелиозависимая вазоконстрикция (ЭЗВК) – на введение N-монометил-L-аргинина (L-NMMA), эндотелионезависимая вазоконстрикция (ЭНЗВК) – на введение норадреналина. Эндотелиозависимые реакции аорты следует рассматривать в качестве NO-зависимых механизмов, а эндотелионезависимые реакции связаны с реализацией гуанилатциклазного механизма вазодилатации.

Полученные результаты можно объяснить функциональными изменениями сосудистого эндотелия вследствие блокады синтеза NO и частичной потерей целостности эндотелиальной выстилки. В ряде исследований доказано, что хроническое воздействие табачного дыма приводит к снижению активности эндотелиальной NO-синтазы и дефициту NO, вследствие чего стимуляция ацетилхолином не вызывает адекватной вазодилатации. При хроническом табакокурении установлено снижение NO-зависимого механизма дилатации аорты.

Кроме NO-синтазного, существует гуанилатциклазный механизм вазодилатации. При определении его роли в индуцированной патологии оценивали степень расширения сосуда при введении известного донатора NO – нитроглицерина. Утолщение интимы, изменение её композитной структуры, гипертрофия гладких миоцитов и появление грубодисперсного коллагена являются причинами нарушений процессов вазодилатации аорты, связанных с активацией гуанилатциклазы [8–12].

*Изучение биологического действия веществ, оказывающих
терапевтический эффект при экспериментальном
геморрагическом инсульте (стереотаксис)*

Сопутствующий геморрагическому инсульту отек головного мозга часто является основной причиной неблагоприятного исхода. В развитии отека большое значение имеют окислительный стресс и свободное железо. Применение препаратов с антиоксидантными и хелаторными свойствами способствует более быстрому уменьшению и лучшему восстановлению неврологических симптомов у животных с экспериментальным геморрагическим инсультом. Одним из эффективных природных препаратов, обладающим антиоксидантными и хелаторными свойствами, является гистохром. Его эффективность и безопасность доказаны экспериментально и подтверждены клинически.

Нами изучено влияние гистохрома на динамику неврологических нарушений при экспериментальном геморрагическом инсульте. Неинвазивные методы визуализации позволяют прижизненно идентифицировать гематому, ее формирование и динамику с момента образования. Это меняет представления о клинических проявлениях гематом и отражается на тактике лечения. Благодаря МРТ появилась возможность быстро получить представление о частоте, тяжести лечения и неблагоприятном прогнозе кровоизлияний в мозг. Это связано с существованием целой группы своеобразно протекающих кровоизлияний без прорыва крови в ликворную систему, диагностика которых затруднена или просто невозможна без применения МРТ.

МРТ расширило представление о функциональных процессах, протекающих в головном мозге при заболеваниях сосудистого генеза. Высокая информативность и надежность этой методики позволяют широко использовать МРТ не только в определении характера инсульта, но и в целях наблюдения за эволюцией патологического процесса. На основании результатов исследований выявлено, что последовательные изменения интенсивности сигнала в гематоме связаны с влиянием процесса окисления гемоглобина на МР-релаксационные механизмы. В сверхострой стадии гематомы обычно изоинтенсивна с серым веществом на T_1 -взвешенных изображениях (ВИ) и гиперинтенсивна на T_2 -ВИ, что связано с наличием богатого белком водного компонента.

В острой стадии кровоизлияния диоксигемоглобин, оставаясь внутри интактных эритроцитов, проявляется очень низким сигналом на T_2 -ВИ. В связи с тем, что влияние диоксигемоглобина не изменяет время релаксации T_1 -ВИ, острая гематома обычно не определяется на T_1 -ВИ и выглядит изоинтенсивной с мозгом. Перифокальный отек хорошо определяется на T_2 -ВИ в виде зоны повышенного сигнала, окружающей гипointенсивную острую гематому.

Показано, что гистохром быстро проникает через гематоэнцефалический барьер и метаболизируется в ЦНС. На это указывает обнаружение продуктов его метаболизма в цереброспинальной жидкости уже через 1.5 часа после внутрибрюшинного введения. Этот факт является принципиально значимым для объяснения механизма действия гистохрома в ЦНС и его влияния на динамику неврологических нарушений при кровоизлияниях в головной мозг [13, 14].

Поиск препаратов, обладающих противоишемическим действием

Согласно литературным данным, строение сосудов мозга грызунов, их топография, молекулярная и клеточная биология нервных клеток имеют высокую степень гомологии с высшими млекопитающими, а инбридинг мелких животных гарантирует относительную гомогенность особей внутри породы.

Универсальной модели, в достаточной мере адекватной ишемическому инсульту у человека, не существует. Моделирование острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) – воспроизведение основного патофизиологического процесса ишемии мозга в определенном бассейне кровоснабжения сводится к прекращению кровотока в определенном сосуде мозга, к окклюзии. Объектом окклюзии является сонная мозговая артерия (СМА), так как у человека именно в бассейне СМА происходит до 75% инфарктов. Транскраниальный доступ к СМА не сопровождается грубым повреждением каких-либо анатомических образований.

В связи с этим в лаборатории воспроизведена экспериментальная модель ОНМК у крыс линии Вистар путем окклюзии левой сонной мозговой артерии (ЛСМАо) [15]. Сравнительный анализ изменения мозгового кровообращения у крыс с ОНМК был выполнен методом магнитно-резонансной ангиографии (МРА). На рис. 3 а показана часть операции ЛСМАо. На рис. 3 б показано обескровливание участка головного мозга крыс после окклюзии.

Известно, что необратимое изменение в мозге человека наблюдается уже в первые 6–8 мин после развития ишемии. Изменения ткани мозга происходят в той его части, где скорость кровотока ниже 15–10 мл/100 г/мин. Вокруг ядра находится большая по объему область «ишемической полутени», или пенумбры, с кровотоком до 50–20 мл/100 г/мин, которая может сохранять жизнеспособность в среднем от 3 до 6 час. Восстановление перфузии в зоне пенумбры в течение терапевтического окна дает возможность сохранить функцию определенной части мозговой ткани в этой области и, соответственно, уменьшить степень развития неврологического дефицита.

Таким образом, создана экспериментальная модель острого нарушения мозгового кровообращения у крыс, пригодная для изучения соединений с потенциальными антиоксидантными свойствами [16].

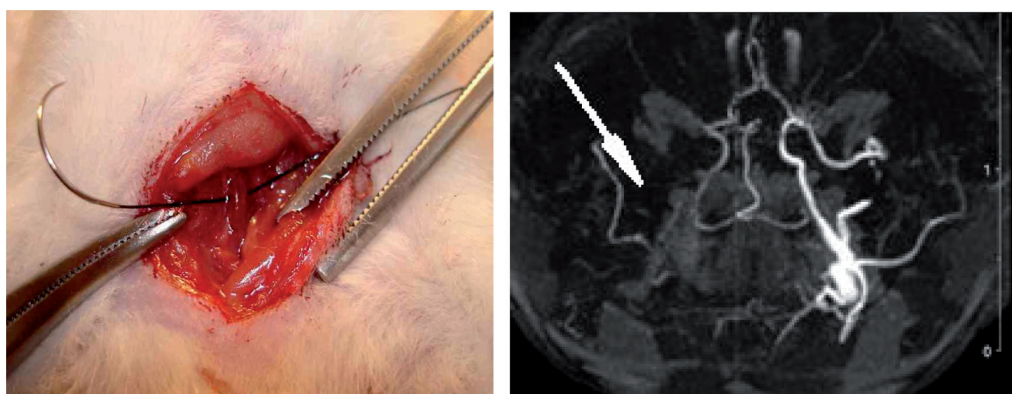


Рис. 3. Острое нарушение мозгового кровообращения у крыс линии Вистар: а – окклюзия левой сонной мозговой артерии; б – стрелкой показано обескровливание участка головного мозга крыс после окклюзии

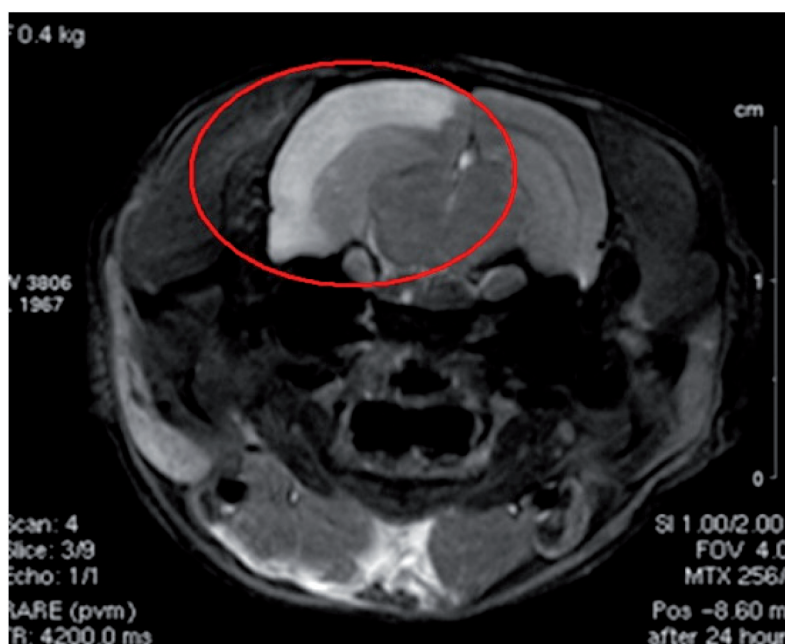


Рис. 4. Ишемия головного мозга крысы. Кольцом обведена зона ишемического инсульта после операции. Появившийся гиперинтенсивный очаг на T2-ВИ в области гиппокампа подтверждает наличие ишемического повреждения ткани мозга животных

Геронтология

В Институте цитологии и генетики СО РАН создана линия крыс OXYS, являющаяся биологической моделью для исследования патогенеза, и связанных с ним «болезней пожилого возраста». Генетический дефект метаболизма крыс OXYS определя-

ет повышенную чувствительность к окислительному стрессу и является причиной их ускоренного старения. У крыс OXYS наблюдалось ускоренное развитие катаракты, остеопороза, хронической ишемии, гипертонии, изменений в эмоциональной и когнитивной сферах, которые свойственны стареющим людям и животным [17].

Ранее было показано, что антиоксиданты способны предупреждать и задерживать развитие хронической ишемии [18]. Для совместных изысканий препаратов с антиоксидантными свойствами и сравнительного изучения влияния гистохрома на структурно-функциональные характеристики мозга методом МРТ крысы OXYS были любезно предоставлены сотрудниками Института цитологии.

Было установлено, что признаки нейродегенеративных изменений присутствуют у крыс OXYS уже в возрасте 3 месяца, а в 12 месяцев они имеют выраженный характер. Гистохром (1 мг/кг в течение 5 дней) в большей степени, чем мексидол как препарат сравнения (4 мг/кг в течение 7 дней) снижал тревожность и повышал поисково-исследовательскую активность годовалых OXYS. Оба препарата позитивно повлияли на морфофункциональные характеристики головного мозга крыс. Их эффекты, связанные с коррекцией диффузных изменений белого вещества, снижением отека, были сопоставимы, но только гистохром снижал выраженность процессов демиелинизации [19, 20].

Во второй серии экспериментов крысам OXYS на фоне ускоренного старения была индуцирована модель ОНМК. Проведен сравнительный анализ изменения мозгового кровообращения на фоне ОНМК и дана оценка изменения церебральных сосудов методом магнитно-резонансной ангиографии. У крыс отмечено нарастание когнитивных расстройств после операции. Процесс кровенаполнения сосудов в окклюзированной зоне у OXYS происходил с патологическими изменениями по сравнению с контрольными Вистар. У Вистар после операции включался коллатеральный кровоток сосудов, который компенсировал ОНМК, поэтому ишемизированные участки оказались незначительными [21].

Изучение препаратов, обладающих гепатозащитным действием

Токсические гепатиты – это поражения печени, вызванные определенными токсическими агентами: продуктами бытовой химии, пестицидами, алкоголем, лекарственными препаратами. В настоящее время эта проблема приобретает все большую актуальность в связи с высокими темпами развития химической и фармацевтической промышленности, широким внедрением их продукции во все сферы жизни человека, злоупотреблением алкоголем и его суррогатами. При токсическом гепатите у больных пациентов появляются диффузные воспалительно-дистрофические поражения печени, нарушение обмена липопротеидов, жировой гепатоз.

В арсенале института имеется большой перечень веществ, обладающих потенциальным гепатозащитным действием. Для изучения таких соединений были индуцированы модели токсического гепатита, фиброза, цирроза печени у лабораторных животных, вызванных тетрахлорметаном. На фоне этих моделей были исследованы гепатозащитные свойства препаратов, таких как кукумариовит, полученный переработкой дальневосточной кукумарии *Cuscutaria japonica*.

Показан положительный эффект кукумариовита на токсические проявления в печени крыс. Выводы о положительном влиянии препарата на структуру печени живот-

ных с токсическим гепатитом подтверждают морфометрические измерения объема печени, измерения интенсивности сигнала от паренхимы на T1- и T2-ВИ, полученных с помощью МР томографии. По результатам работы оформлен патент [22].

Изучены гепатопротекторные свойства фукоидана из бурой водоросли Дальнего Востока *Fucus evanescens* на морфологию (данные МРТ) и показатели биохимической активности печени при экспериментальном хроническом токсическом гепатите у мышей, индуцированном тетрахлорметаном. В ходе эксперимента выявлена нормализация морфологической структуры и функционального состояния печени под влиянием фукоидана при его пероральном применении с лечебной и с профилактической целью. Полученные результаты свидетельствуют о гепатопротекторной активности фукоидана и открывают новые перспективы его клинического применения [23].

Таким образом, создано или поставлено более 10 экспериментальных моделей различных заболеваний для мониторинга эффективности исследуемых препаратов с широким диапазоном фармакологической активности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант 12-I-P6-11), фонда РФФИ (грант № 11-04-00052), гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-546.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedorov S.N., Radchenko O.S., Shubina L.K., Balaneva N.N., Agafonova I.G., Bode Ann M., Jin Jun-O., Kwak J., Zigan D., Stonik V.A. // *Anticancer Res.* 2008. V. 28. P. 927–932.
2. Agafonova I.G., Aminin D.L., Radchenko O.S., Novikov V.L., Stonik V.A. // *Magnetic Resonance Imaging.* 2008. V. 26, No. 6. P. 763–769.
3. Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Котельников В.Н., Гвозденко Т.А., Королев И.Б., Караман Ю.К., Агафонова И.Г. // Патент № 2327228, опубл. 20.06.2008. Бюл. № 17.
4. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Kolosova N.G., Stonik V.A. // *Appl. Magn. Resonance.* 2012. V. 42, No. 4. P. 487–497.
5. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Агафонова И.Г., Королев И.Б., Антонюк М.В., Новгородцева Т.П., Ли В., Лукьянов П.А. // Бюлл. физиол. патол. дыхания. 2007. Вып. 25. С. 22–25.
6. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Агафонова И.Г., Антонюк М.В., Новгородцева Т.П., Королев И.Б., Гвозденко Е.А., Лукьянов П.А. // Материалы научной сессии Общего собрания ДВО РАН «Фунд. науки – медицине». Изд. Дальнаука. 2008. С. 73–80.
7. Турмова Е.П., Григорюк А.А., Маркелова Е.В., Коцюрбий Е.А., Щедрина О.Б., Агафонова И.Г., Красников В.Е., Пашко Н.К. // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. 19, № 2. С. 276–279.
8. Гельцер Б.И., Бродская Т.А., Котельников В.Н., Агафонова И.Г., Лукьянов П.А. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2007. Т. 12. С. 617–620.
9. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Бродская Т.А., Агафонова И.Г., Лукьянов П.А. // Рос. физиол. журнал. 2008. № 2. С. 207–211.
10. Гельцер Б.И., Котельников В.Н., Бродская Т.А., Агафонова И.Г., Лукьянов П.А. // Патологическая физиол. эксп. терапия. 2008. № 2. С. 5–7.

11. Бродская Т.А., Невзорова В.А., Гельцер Б.И., Коцюрбий Е.А., Агафонова И.Г., Лукьянов П.А. // Бюлл. СО РАМН. 2009. № 1. С. 135.
12. Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Гончар Е.Ю., Агафонова И.Г. // Бюл. эксп. биол. мед. 2013. В. 155, № 3. 275–278.
13. Стоник В.А., Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Гусева М.Р., Щукин И.А., Агафонова И.Г., Мищенко Н.П., Федореев С.А. // Докл. АН. 2005. Т. 405, № 5. С. 1–3.
14. Гусев Е.И., Стоник В.А., Мартынов М.Ю., Гусева М.Р., Щукин И.А., Агафонова И.Г., Мищенко Н.П., Федореев С.А. // Журнал неврологии и психиатрии. 2005. Вып. 15. С. 60–66.
15. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А., Шапкин А.Г., Раевская Л.Ю., Голубев С.С., Мурик С.Э. // Эксп. и клин. фармакология. 2001. Т. 64, Вып. 4. С. 63–67.
16. Агафонова И.Г., Колосова Н.Г., Рассказов В.А. // Тихоокеанский мед. журн. 2012. № 1. С. 104–107.
17. Колосова Н.Г., Щеглова Т.В., Амстиславская Т.Г., Лоскутова Л.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2003. Т. 132, № 8. С. 54–61.
18. Закирова А.И., Лебедев А.В., Кухарчук В.В., Мищенко Н.П., Федореев С.А. // Терапевтический архив. 1996. № 8. С. 12–14.
19. Агафонова И.Г., Колосова Н.Г. Мищенко Н.П. Чайкина Е.Л. Стоник В.А. // Бюлл. эспер. биол. мед. 2007. Т. 143, Вып. 4. С. 446–450.
20. Агафонова И.Г., Котельников В.Н., Мищенко Н.П., Колосова Н.Г. // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2010. Т. 150, № 12. С. 686–691.
21. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Kolosova N.D., Stonik V.A. // Appl. Magn. Resonance. 2012. Vol. 42, No. 4. 487–497.
22. Стоник В.А., Агафонова И.Г., Аминин Д.Л., Антонов А.С., Иващенко В.Ф., Макарьева Т.Н., Ребачук Н.М. Патент 2426453, опубл. 20.08.2011. Бюл. № 23.
23. Кузнецова Т.А., Агафонова И.Г., Крохмаль Т.С., Звягинцева Т.Н., Филонова Н.В. // Тихоокеанский мед. журн. 2010. № 4. С. 26–29.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ КАК КОРРЕКТОРЫ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

О. Н. Кривошапко^{1*}, А. М. Попов^{**}, А. А. Артюков^{*}

^{*} Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159;

^{**} Дальневосточный федеральный университет, Россия, Владивосток

В данной обзорной статье обсуждены результаты изучения медико-биологической активности природных антиоксидантов – эхинохрома А из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* и основных компонентов полифенольного комплекса из морской травы *Zostera marina* (розмариновой кислоты, лутеолина и 7,3'-дисульфата лутеолина), на экспериментальных моделях патологий углеводного и липидного обмена. На основании полученных результатов с использованием современных литературных данных обсуждены предполагаемые механизмы действия исследованных биологически активных веществ.

Ключевые слова: лутеолин, 7,3'-дисульфат лутеолина, розмариновая кислота, 1,4-нафтохиноны, диабет, гиперлипидемия.

Secondary metabolites of marine organisms as proofreaders of abnormal lipid and carbohydrate metabolism. O. N. Krivoshapko^{1*}, A. M. Popov^{**}, A. A. Artyukov^{*} (*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia; **Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia)

In this review, the medical and biological activities of natural antioxidants, echinochrome A from the flat sea urchin *Scaphechinus mirabilis* and the main components of the polyphenol complex from the sea grass *Zostera marina* (rosmarinic acid, luteolin, and 7,3'-luteolin disulfate) in experimental models of carbohydrate and lipid metabolism pathologies are discussed. The results obtained along with literature data propose molecular mechanisms of action of the studied biologically active substances.

Keywords: luteolin, 7,3'-luteolin disulfate, rosmarinic acid, 1,4-naphthoquinone, diabetes, hyperlipidemia.

Одной из актуальных задач современной биомедицины является поиск новых биологических источников биологически активных веществ (БАВ), обладающих различными механизмами защитного действия, которые направлены на коррекцию нарушений биохимического статуса организма. В настоящее время установлено [1], что сахарный диабет и гиперлипидемия являются в значительной мере болезнями воспаления. При патологии углеводного и липидного обмена корригирующее действие ока-

¹ Автор для связи (тел.: +7 (423) 231-16-61; эл. почта: krivoshapko@mail.ru).

Сокращения: ЭХА – эхинохром А; РК – розмариновая кислота; ЛТ – лутеолин; ДСЛ – 7,3'-дисульфат лутеолина; БАВ – биологически активные вещества; МДА – малоновый диальдегид; РС – рецептор-сквенджер; окс-ЛПНП – окисленные липопротеиды низкой плотности.

зывают антиоксиданты, которые играют важную роль в профилактике заболеваний. Эти низкомолекулярные метаболиты обладают способностью ингибировать перекисное окисление липидов, стабилизировать структуру и функции мембран клеток и тем самым создавать оптимальные условия для гомеостаза клеток и тканей при разнообразных воздействиях патогенных факторов на организм.

Принято считать, что биологическая активность полигидроксинафтохинона эхинохрома А (ЭХА), активного начала созданного в ТИБОХ ДВО РАН кардиопротекторного препарата «Гистохром®» (рис. 1а), связана с его выраженной противовоспалительной активностью [2]. Однако корректирующие свойства ЭХА при нарушениях углеводного и липидного обмена до настоящего времени изучены слабо.

Хорошо известно, что полифенольные соединения, как одна из самых многочисленных групп вторичных метаболитов растений, обладают широким спектром полезных биомедицинских свойств и отличаются плеiotропным характером биологического действия как на уровне клетки, так и на уровне организма [3]. Лютеолин (ЛТ) и розмариновая кислота (РК) (рис. 1б, в), являются одними из наиболее хорошо изученных представителей полифенолов, незаменимыми компонентами пищи человека и других млекопитающих, которые, изменяя активность различных ферментов обмена веществ, сигнальных путей и рецепторов-мишеней, обладают широким спектром фармакологической активности, включая профилактику и лечение атеросклероза и сахарного диабета [4-6].

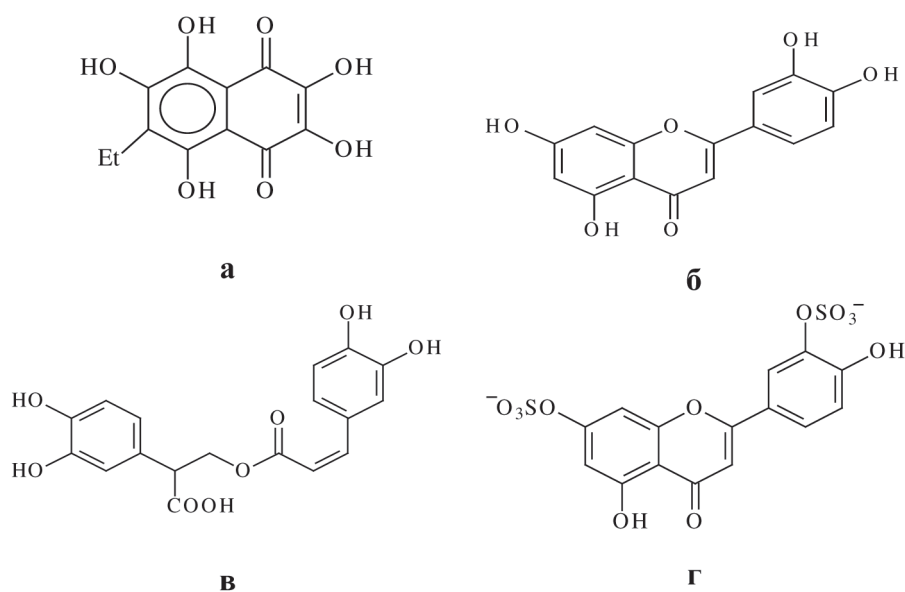


Рис. 1. Структурные формулы эхинохрома А (а), лютеолина (б), розмариновой кислоты (в), 7,3'-дисульфата лютеолина (г)

При изучении полифенольных соединений морской травы *Zostera marina* нами было показано, что одной из основных частей полифенольного комплекса являются сульфатированное производное ЛТ 7,3'-дисульфат лютеолина (ДСЛ) (рис. 1г) [7], для

которого в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН была разработана технология получения.

Нами были проведены экспериментальные исследования *in vivo* корректирующих свойств ЭХА, РК, а также на примере ЛТ и ДСЛ проанализирована вероятная роль сульфатирования в фармакологической активности биофлавоноидов. Мы предполагаем, что выяснение механизмов фармакологической активности вышеуказанных БАВ, в конечном счете, приведет к разработке новых эффективных протективных агентов как средств дополнительной терапии при нарушениях углеводного и жирового обмена.

Экспериментальная модель кардиопатологии, индуцированная плавательной нагрузкой и введением мезатона, широко используется для воспроизведения экстремальных стрессовых нагрузок на сердечно-сосудистую систему организма. Как показал эксперимент [8], по интегральному показателю позитивного действия – выживаемости животных в условиях стресса – эффективными протекторными препаратами оказались ЛТ и ЭХА (100%-ная выживаемость), а РК не проявляла протекторной активности по сравнению с контрольной группой (группа «Стресс») (выживаемость в этих группах составила 60%).

При изучении биохимических параметров, характеризующих липидный метаболизм у выживших животных, не было отмечено заметных изменений, которые бы выявили четкие тенденции. Учитывая важную роль гормональных механизмов регуляции реакций организма в ответ на действие стресса, для нас представляла интерес оценка уровня половых гормонов в сыворотке крови экспериментальных животных. Было установлено, что во всех экспериментальных группах наблюдается снижение уровня тестостерона в сыворотке крови животных и расчетного показателя, характеризующего отношение уровня тестостерона к уровню эстрадиола. Особенно заметное снижение относительного содержания тестостерона происходит в крови животных, получавших препарат ЛТ. Возможно, это связано с активностью данного препарата как селективного модулятора эстрогеновых рецепторов [9].

Известно, что эстрогены проявляют сильный антиоксидантный эффект *in vivo*. Эстрадиол индуцирует синтез глутатионпероксидазы-1 и супероксиддисмутазы. Этот процесс требует участия эстрогенового рецептора и активации путей, которые обычно включаются в ответ на окислительный стресс (он проявляется в тесте принудительного плавания). Увеличение уровня указанных выше ферментов может предотвратить нарушения, вызываемые окислительным стрессом [10].

Обычные последствия действия длительного стресса на организм – это развитие лейкопении, изменение лейкоформулы и транзиторная иммуносупрессия. Из установленных в нашем эксперименте изменений гемограммы при стрессе особенно значимой является тенденция к развитию лейкопении и нейтропении – изменения, характеризующие снижение общей резистентности организма. В группах животных, получавших препараты ЛТ и ЭХА, наблюдается коррекция этих параметров крови до показателей интактного контроля. РК такого корректирующего эффекта не обеспечивала. Моноцитоз, обнаруженный у крыс, подвергшихся действию стресса, сохранялся во всех экспериментальных группах. Однако только применение ЭХА приводило к коррекции лейкоформулы [8].

Таким образом, препараты ЛТ и ЭХА по-разному влияют на показатели важнейших компонентов клеточных механизмов неспецифической резистентности. Следует

отметить, что ЛТ относится к сильным модуляторам микроглии (резидентальных макрофагов нервной системы), воздействуя на сигнальные пути, которые ведут к повышению противовоспалительного и антиоксидантного потенциала нервной системы и организма в целом [11]. При этом не было выявлено существенных различий между группами по уровню содержания интерферона- γ . Различия в исследуемых группах по уровню интерлейкина-4 оказались более заметными. Во всех группах животных, подвергшихся действию экспериментального стресса, выявляется односторонняя тенденция – снижение содержания интерлейкина-4 в сравнении с интактными животными. При этом ЛТ и ЭХА проявляют активность в плане восстановления содержания этого цитокина, важного для генерации механизмов В-клеточного иммунитета. Особенно эта восстановительная тенденция прослеживается в группе животных, получавших препарат ЭХА.

Учитывая то обстоятельство, что используемая нами мезатоновая модель стресса в условиях повышенной нагрузки на сердце приводила к ухудшению трофики миокарда, особый интерес представляла морфологическая оценка состояния тканей миокарда и собственно кардиомиоцитов.

Как показал анализ электронных снимков срезов сердца [8], в группе интактных животных кардиомиоциты имели нормальное строение: их миофибриллы были равномерно сокращены, каналцы саркоплазматического ретикула не расширены, митохондрии равномерно распределены, а кристы, по большей части, были плотно упакованы и расположены параллельно.

В группе животных, подвергнутых стрессу и принимавших ЛТ и ЭХА, на электронных микрофотографиях кардиомиоцитов был зарегистрирован чрезвычайно развитый митохондриальный аппарат [8]. При этом в подавляющем большинстве митохондрии имели плотно расположенные кристы, а проявления митоптоза были незначительны, что очевидно отражает роль ЛТ и ЭХА в защите кардиомиоцитов от окислительного стресса.

Таким образом, на ультраструктурном уровне впервые было показано, что препараты ЛТ и ЭХА, по-видимому, обладают протективным действием при экспериментальном стрессе, что выражается в сохранении нормальной структуры миофибрилярного аппарата и митохондрий кардиомиоцитов у животных, получавших данные препараты перорально на фоне действия стрессового фактора. При этом, защитный эффект препаратов ЛТ и ЭХА выражен примерно в одинаковой степени и существенно превосходит протективную активность РК.

Экспериментальные исследования показывают [8], что ЭХА проявляет себя как высокоэффективный противовоспалительный агент при кардиопатологии. Мы предполагаем, что на клеточном уровне его протективный эффект определяет целый ряд факторов, которые отражены на рис. 2. Можно видеть, что ЭХА является мощным детоксикантом супероксид-аниона и перекисных радикалов, образуя с ними нейтральные нетоксичные комплексы. Важно отметить тот факт, что ЭХА в результате аутоокисления и взаимодействия в организме с ДТ-диафоразой эндотелиальных клеток сосудов, продуцирует в физиологических концентрациях H_2O_2 , которая является сильным внутриклеточным медиатором синтеза ферментов антиоксидантной защиты организма (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и др.). Кроме того, H_2O_2 , имея высокое сродство к рецептору инсулина и выполняя сигнальную роль, усиливает метаболизм глюкозы и снижает ее количество в крови. К тому же H_2O_2

обладает сосудорасширяющим действием, уменьшая проявления гипертонии. Важно отметить и тот факт, что в условиях ишемии и гипоксии H_2O_2 является дополнительным источником получения кислорода клетками за счет ее разложения при действии каталазы. Роль H_2O_2 как плейотропной сигнальной молекулы проявляется также в резком усилении синтеза разных видов PPAR – главных регуляторов углеводного и липидного обмена. Все эти факторы самым положительным образом сказываются на протективной активности ЭХА при сердечно-сосудистых патологиях, а также при нарушениях липидного и углеводного обмена.



Рис. 2. Предположительные механизмы действия ЭХА при нарушении липидного и углеводного обменов

Что касается протективных свойств РК, то известно, что это полифенольное соединение обладает очень высокой антиоксидантной активностью [12, 13]. Однако, если судить по результатам моделирования различных патологий, антиоксидантная активность РК не всегда коррелирует с позитивным протективным действием на организм. РК обеспечивает улавливание, стабилизацию и обезвреживание активных форм кислорода, защищая белки, ферменты и ДНК от их прямого действия, а также проявляет противовоспалительную активность, действуя по разным внутриклеточным биохимическим путям, а именно: 1) ингибирует образование ферментов (фосфолипазы A_2 , циклооксигеназы, липоксигеназы), принимающих участие в синтезе эйкозаноидов. Вследствие этого уменьшает содержание провоспалительных молекул (простагландинов и лейкотриенов); 2) ингибирует факторы активации транскрипции, модулирующие экспрессию провоспалительных генов (циклооксигеназы-2, индуцибельной NO синтазы, фактора некроза опухоли- α , а также интерлейкинов-1 β и 6). Кроме этого РК может ингибировать экспрессию генов, связанных с промотором фактора транскрипции NF- κ B. Таким образом, можно заключить, что РК обладает плейотропным характером биологического действия, в основе которого лежат, прежде всего, антиоксидантный и противовоспалительный эффекты. Следует отметить, что относительно

высокие дозы РК могут оказывать иммуносупрессивное действие, что может приводить к негативному влиянию на функциональную активность организма в целом [14].

Сульфатирование – важный путь метаболизма биофлавоноидов, в том числе и флавона ЛТ, в растениях. В морской траве *Z. marina* нами обнаружено значительное количество сульфатированной формы ЛТ (ДСЛ) и разработан доступный способ его получения. При изучении ЛТ и ДСЛ на экспериментальной модели аллоксанового диабета наиболее эффективным показал себя ДСЛ в дозе 0.5 мг/кг (уменьшение на 30%). Введение аллоксана уменьшало вес поджелудочной железы не менее чем на 20%. ЛТ по своему защитному действию в отношении поджелудочной железы (если судить по ее весу) не уступал ДСЛ. При исследовании уровня глюкозы в глюкозо-толерантном тесте было выявлено, что ДСЛ наиболее эффективно проявляет себя в дозе 0.5 мг/кг, в то время как ЛТ показывает наилучший эффект в дозе 2 мг/кг. Концентрация билирубина в группе животных с индуцированным аллоксановым диабетом (отрицательный контроль) возрастала приблизительно на 20%. ДСЛ в дозе 0.2 мг/кг снижает его содержание до нормальных значений. Препарат ЛТ в исследуемом диапазоне не обладал нормализующим действием в отношении данного показателя. В группе животных (отрицательный контроль) наблюдалось приблизительно 50%-ное повышение содержания малонового диальдегида (МДА). ДСЛ в дозе 0.1 и 0.2 мг/кг резко уменьшал уровень МДА в плазме крови, доводя его до нормальных значений (интактные животные). Аналогичное действие оказывал и ЛТ, но в дозах в 10 раз выше (1.0 и 2.0 мг/кг). То есть ДСЛ обладает более выраженным протективным действием, чем ЛТ и препарат сравнения «Глибенкламид», который широко применяется при лечении сахарного диабета 2-го типа [15].

При изучении гипOLIПидемической активности на модели экспериментальной гиперлипидемии было показано, что ДСЛ слабо влияет на уровень триглицеридов и

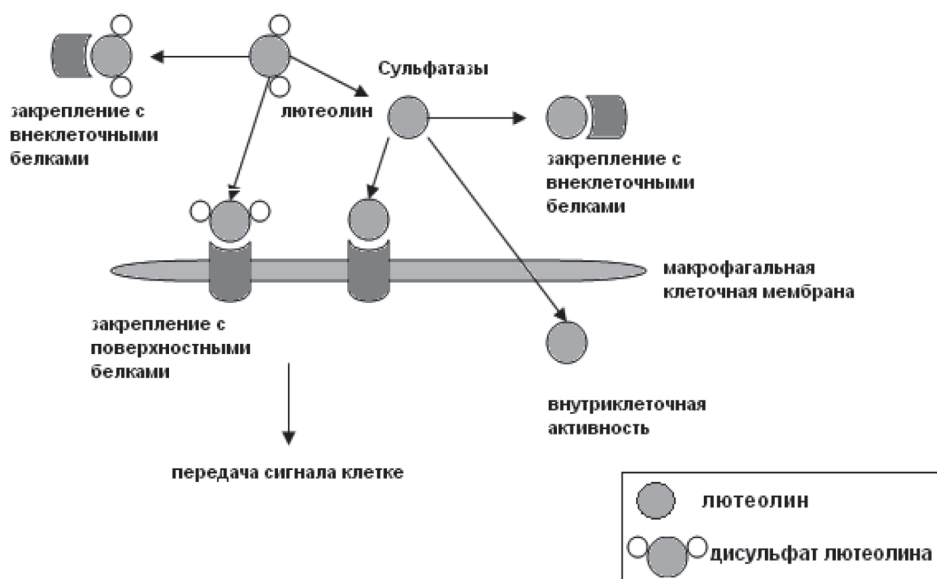


Рис. 3. Предполагаемая схема протективного действия ЛТ и ДСЛ на примере макрофагальных клеток

общего холестерина в плазме крови животных, в то время как действие ЛТ на эти параметры было более значимо. Следует особо отметить, что ДСЛ в дозе 1.0 мг/кг увеличивает примерно в 2 раза концентрацию липопротеидов высокой плотности в плазме крови животных. На уровень липопротеидов очень низкой плотности ЛТ оказывает более значимое действие, в дозе 0.1 мг/кг снижая этот показатель наиболее эффективно [15]. Полученные нами данные позволяют высказать предположение, что ДСЛ и ЛТ могут взаимодействовать с одними и теми же рецепторами-мишенями и вызывать фармакологический эффект, как показано на рис. 3 [7].

Очевидно, что ДСЛ – это природная водорастворимая форма ЛТ, которая попадает в плазму крови, минуя стадии модификации клетками кишечника и печени. ДСЛ обладает меньшим токсическим потенциалом, чем ЛТ, что повышает эффективность его физиологического действия. В связи с этим разработка лечебно-профилактических средств на основе ДСЛ представляется более перспективной, чем на основе ЛТ, который уже сейчас применяется в лечебной практике [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeong E., Lee J.Y. // Yonsei Med J. 2011. V. 52, No. 3. P. 379–392.
2. Артюков А.А., Попов А.М., Цыбульский А.В., Кривошапко О.Н., Полякова Н.В. // Биомедиц. хим. 2013. Т. 7, № 3. С. 239–244.
3. Кривошапко О.Н., Попов А.М., Артюков А.А., Костецкий Э.Я. // Биомедиц. химия. 2012. Т. 58, № 2. С. 189–198.
4. Mueller M., Lukas B., Novak J., Simoncini T., Genazzani A.R., Jungbauer A. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56, No. 24. P. 11621–11630.
5. Ding L., Jin D., Chen X. // J. Nutr. Biochem. 2010. V. 21, No. 10. P. 941–947.
6. Barbier O., Torra I.P., Duguay Y., Blanquart C., Fruchart J.C., Glineur C., Staels B. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002. V. 22, No. 5. P. 717–722.
7. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. // Биофарм. журн. 2012. Т. 4, № 4. С. 27–41.
8. Кривошапко О.Н. // Автореф. дис... канд. биол. наук. Владивосток: ТИБОХ. 2012. 26 с.
9. Huang Z., Fang F., Wang J., Wong C.-W. // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 22–26.
10. Vina J., Borras C., Gomez-Cabrera M.C., Orr W.C. // Free Radic. Res. 2006. V. 40, No. 2. P. 111–119.
11. Dirscherl K., Karlstetter M., Ebert S., Kraus D., Hlawatsch J., Walczak Y., Moehle C., Fuchshofer R., Langmann T. // J. Neuroinflammation. 2010. V. 7, No. 3. P. 1–16.
12. Ferreira L.G., Celotto A.C., Capellini V.K., Albuquerque A.A., de Nadai T.R., de Carvalho M.T., Evora P.R. // Acta Cir. Bras. 2013. V. 28, No. 1. С. 83–87.
13. Kelsey N.A., Wilkins H.M., Linseman D.A. // Molecules. 2010. V. 15, No. 11. С. 7792–7814.
14. Кривошапко О. А., Попов А. М. // Вопр. питания. 2011. № 2. С. 4–8.
15. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. // Биофарм. журн. 2011. Т. 3, № 4. С. 27–33.

БИОПРЕПАРАТ ДВ–47–4: ПРИМЕНЕНИЕ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

М. М. Анисимов¹, Г. Н. Лихацкая, В. В. Логачев

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.*

В результате экспериментальных работ показано, что биопрепарат ДВ–47–4 стимулирует рост проростков семян и продуктивность сельскохозяйственных культур, повышает устойчивость растений к фитопатогенным грибам, оказывает стимулирующее действие на рост и развитие посадочного материала плодовых культур и сеянцев кедра корейского. Гуминовые кислоты, как основная составляющая биопрепарата ДВ–47–4, выполняют, в основном, роли модификаторов структурно-функциональных свойств мембран.

Ключевые слова: биопрепарат ДВ–47–4, гуминовые кислоты, стимуляторы роста и продуктивности растений, микрокалориметрия, бислойные мембраны.

The biological product DV–47–4: application in plant and mechanisms of action.

M. M. Anisimov¹, G. N. Likhatskaya, V. V. Logachev (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Russia)

The biological product DV–47–4 was shown to have a stimulatory effect on the growth of seedling and crop productivity and on the growth and development of planting material of fruit crops and Korean pine seedlings, to increase plant resistance to fungus. Humic acids are the main component of a biological preparation DV–47–4, that acts as a modifier of structural and functional properties of the membranes.

Keywords: biological preparation DV–47–4, humic acid, growth factors, plant productivity; microcalorimetry; model membrane.

В последние годы все большее внимание уделяется поиску биологически активных веществ (БАВ), повышающих урожайность сельскохозяйственных культур и устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям. К числу таких веществ относятся природные вещества, способные в зависимости от концентрации стимулировать или ингибировать ростовые процессы у растений. Это направление уже нашло широкое практическое применение в сельском хозяйстве. Стимуляторы роста, фитогормоны, например гиббереллины и брассинолиды, реторданты и другие биорегуляторы широко используют для повышения урожайности, защиты растений, синхронизации созревания, увеличения сохранности плодов и т.д.

Изучение ответных реакций растений на действие такого рода веществ актуально и своевременно, так как расширяет наши знания о структурно-функциональных свойствах метаболитов растений и применяемых для их обработки БАВ и позволяет

¹ Автор для связи (тел.: +7(423) 231-99-32; эл. почта: anisimov@piboc.dvo.ru).

целенаправленно воздействовать на растения с целью повышения их продуктивности и устойчивости к болезням.

В Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН разработаны технологии получения и применения биопрепарата для сельского хозяйства, который получил название ДВ-47-4. Препарат ДВ-47-4 проходил полевые испытания в различных хозяйствах Приморского и Хабаровского краев, Амурской и Кемеровской областях, в том числе: в совхозе «Тепличный», г. Благовещенск Амурской области; совхозе «Фёдоровский», г. Хабаровск; ДальНИИСХ, г. Хабаровск; совхозе «Приморье», г. Владивосток Приморского края; подсобном хозяйстве Минобороны России «Западное» в Надеждинском районе Приморского края; Приморском НИИСХ РАСХН и других хозяйствах.

В лабораторных и производственных экспериментах биопрепарат ДВ-47-4 показал положительные результаты при испытаниях на различных сельскохозяйственных культурах. Этот биопрепарат состоит, в основном, из гуматов натрия или калия, суммы каулозидов из растения стеблелиста мощного (оба компонента местного происхождения) и набора микроэлементов. Он представляет собой жидкость тёмно-коричневого цвета, без запаха и вкуса, имеет $pH=8-9$ (5%-ный раствор по содержанию натриевой или калиевой соли гуминовой кислоты). Препарат – очень недорогой и позволяет обрабатывать значительные площади и массы семян. Им, разведенным в 1000 раз, поливают почву под растениями, опрыскивают зелёные растения во время их роста, обрабатывают семена [1].

Влияние биопрепарата ДВ-47-4 на рост проростков семян сельскохозяйственных культур. Семена и проростки огурца, сои и гречихи обычно используются в качестве биологического теста при исследовании свойств биологически активных соединений. Эти биотесты позволяют отслеживать не только общую реакцию проростков на действие биологически активных соединений, но и учитывать индивидуальные особенности каждого организма в связи с уровнем его метаболизма [2].

Прорастание семян – процесс перехода семян от состояния покоя к интенсивной жизнедеятельности, в результате чего трогается в рост зародыш, и образуется проросток, из которого развивается молодое растение. Это происходит только при достаточном обеспечении их влагой, кислородом, при определённом температурном, а иногда и световом режиме и характеризуется повышением обмена веществ в зародыше и эндосперме.

Проведена оценка рострегулирующей активности биопрепарата ДВ-47-4 на проростках огурца *Cucumis sativus* L. (сорт Каскад), сои *Glycine max* (L.) Merr. (сорт Приморская 69) и гречихи *Fagopyrum esculentum* Moech. (сорт Изумруд). Работа проводилась сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН и Приморского научно-исследовательского института сельского хозяйства РАСХН. Для оценки биологического действия испытуемых веществ использовали технику проращивания семян в рулоне фильтровальной бумаги [2].

При изучении препарата ДВ-47-4 в концентрации 0.1% в условиях защищенного грунта (ОАО «Суховский», г. Кемерово) установлено, что энергия прорастания семян огурца на 2-ые сутки увеличивалась на 47.0%, семян томата на третьи сутки – на 22.6% по сравнению с контролем. Препарат ДВ-47-4 оказывает стимулирующее действие на рост корня проростков огурца *C. sativus* L. в концентрациях 0.0005–

0.05%. Наибольший эффект (20% прирост) отмечен при концентрации биопрепарата ДВ-47-4 0.005% [3].

Влияние биопрепарата ДВ-47-4 на рост корней проростков сои определяли на восьми районированных и перспективных сортах сои: Приморская 13, Ходсон, Венера, Приморская 301, Приморская 81, Приморская 69, Приморская 51, Приморская 529. Препараты совместно с пленкообразователем NaКМЦ (5%-ный раствор) наносили на семена опрыскиванием. После этого их проращивали в рулонах из фильтровальной бумаги и на 7-е сутки измеряли длину корней. Показано, что у исследованных сортов сои, ввиду их биологических особенностей, реакция на действие биопрепарата ДВ-47-4 различалась. У сортов Приморская 529 и Приморская 301 увеличение длины корня было максимальным и составило 9.0 см по сравнению с контролем [4].

Оценка эффективности действия биопрепарата ДВ-47-4 на рост корней проростков гречихи (сорт При 7; Приморский НИИСХ; 2005-2007 гг.; селекции Приморского НИИСХ) показала, что рост корня проростков увеличивался на 20% [5].

Влияние биопрепарата ДВ-47-4 на продуктивность сельскохозяйственных культур. Применение препарата ДВ-47-4 в открытом грунте для корневого полива увеличило урожайность перца сладкого до 357.8 ц/га (в контрольном варианте – 319.8 ц/га). Повышение урожайности составило 11.8%. Комплексное использование препарата (корневой полив и опрыскивание растений по листу) позволило увеличить урожайность на 19.1% (контроль – урожайность 288.4 ц/га, опыт – 343.6 ц/га) [6, 7].

Плодоношение огурцов и томатов при обработке препаратом ДВ-47-4 происходило на 5–7 дней раньше по сравнению с контролем, что позволяло получать и реализовывать продукцию в более ранние сроки. В результате использования препарата ДВ-47-4 (2007–2008 и 2008–2009 гг.) получена прибавка урожайности плодов огурца в количестве 3.2 кг/м² и томата – 3.9 кг/м² [3].

Обработка семян сои препаратом ДВ-47-4 (Приморский НИИСХ РАСХН) привела к более высокой семенной продуктивности посевов. Урожайность сои повысилась на 14.7% (21.7 и 24.9 ц/га соответственно [4].

Влияние биопрепарата ДВ-47-4 на устойчивость растений к болезням. При оценке посевов на поражение грибными болезнями на естественном фоне Приморского края было отмечено, что ускоритель роста ДВ-47-4 был эффективным в отношении защиты растений. Средняя степень поражения сои септориозом при обработке семян препаратом была ниже на 19.1%, пероноспорозом – на 34.5%, церкоспорозом – на 5.7% [4, 8].

В Кемеровской области соя повсеместно поражается фузариозом, аскохитозом, пероноспорозом, септориозом и другими грибными болезнями. Так, сорт СибНИИК-315 поражается фитофторозом на 10–65.9 %. Особо уязвима культура в фазе всходов. Исключительно вредоносны для этой культуры и бактериозы. После того как семена и растения обрабатывали ускорителем роста растений ДВ-47-4, поражение всходов бактериозом с 25.9% (в контроле) снизилось до 11.4%; фузариозом – с 15.3% до 8.5%. В 3 раза уменьшилось поражение вегетирующих растений аскохитозом, пероноспорозом и септориозом [8].

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ускоритель роста растений ДВ-47-4 уменьшает развитие фитофтороза, аскохитоза, бактериоза, пероноспороза на сое, и стимулируют иммунитет растений к заболеваниям.

Применение биопрепарата ДВ-47-4 в садоводстве. Опыты проводили в производственном питомнике Приморской ПЯОС. Препарат ДВ-47-4 в разведении 1:500 и 1:1000 стимулировал рост и развитие сеянцев Ранетки пурпуровой, и к концу вегетации был получен качественный выровненный подвойный материал. Этот же препарат в разведении 1:100 оказывал ингибирующее действие на рост и развитие сеянцев. В этом варианте приживаемость прививок была больше, чем в контроле, и составила 80%.

В то же время при разбавлении биопрепарата ДВ-47-4 1:1000 он тормозил развитие корневой системы у сорта яблони Абориген. Определение диаметра побега и состояния корневой системы весенних прививок абрикоса сорта Хабаровский показало, что после обработки препаратом ДВ-47-4 в разведении 1:1000 эти параметры превышают контрольный уровень.

Проведённые в 2006 г. поисковые опыты по применению препарата ДВ-47-4 в плодоводстве показали, что этот препарат может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на рост и развитие посадочного материала плодовых культур. Необходимо продолжить работы этого типа и провести более полные полевые исследования.

Изучение некоторых элементов роста и развития кедра корейского при действии биопрепарата ДВ-47-4. В Приморском селекционном центре г. Артёма Приморского края в плёночных теплицах изучалось влияние ДВ-47-4 на рост и развитие сеянцев кедра корейского (*Pinus koraiensis* Sieb. Et Zucc.). Показано, что обработка биопрепаратом ДВ-47-4 увеличивает длину стволика сеянцев и корневую систему. На субстрате с цеолитом после обработки препаратом ДВ-47-4 высота сеянцев увеличивалась на 192%, а на субстрате с перлитом – на 142% по сравнению с контролем.

О механизме действия препарата ДВ-47-4. Первым этапом действия препарата на клетки растений является взаимодействие его с компонентами клеточных мембран. Мембраны играют важную роль в передаче сигнала от биорегулятора на внутриклеточные процессы и в регуляции клеточной активности. Мембранная активность препаратов важна для оценки их как биорегуляторов.

В литературе продолжают накапливаться данные о физиологической активности гуматов натрия и биопрепарата ДВ-47-4 [3, 7, 9], но механизмы их взаимодействия с мембранами остаются недостаточно изученными и во многом дискуссионными. Многие авторы считают, что в основе биологического действия гуматов лежит их способность модифицировать функциональные свойства мембран [10, 11]. Показано, что гуминовые кислоты оказывают влияние на активный и пассивный транспорт ионов через мембраны [12, 13], в том числе и на внутриклеточный уровень кальция в растительных клетках [13]. С помощью кальций-специфичного флуоресцентного зонда “fura 2” показано, что гуминовые кислоты увеличивают уровень содержания внутриклеточного кальция только в присутствии ионов кальция во внешней среде, что указывает на вход кальция в клетки при инкубации их с гуминовыми кислотами.

Мембранотропное действие низкомолекулярной фракции более эффективно по сравнению с высокомолекулярной фракцией гуминовых кислот [12]. Имеются данные о том, что одной из причин физиологической активности гуминовых кислот являются наличие в их молекулах фрагментов, обладающих свойствами стабильных свободных радикалов [14, 15], содержание которых снижается с увеличением доли высокомолекулярных фракций в составе гуминовых кислот.

Тритерпеновые гликозиды растений относятся к классу низкомолекулярных биорегуляторов, молекулярный механизм мембранотропного действия которых состоит в образовании ионных каналов и неселективных пор, нарушении структуры мембран при взаимодействии с компонентами биологических мембран [16, 17]. Каулозиды стимулируют активность клеток в низких концентрациях и ингибируют их активность в высоких концентрациях [18].

Механизмы мембранотропного действия компонентов препарата ДВ-47-4 были изучены методом микрокалориметрии и техники модельных мембран [17]. Изучено влияние суммарного препарата натриевых солей гуминовых кислот и их низко- и высокомолекулярной фракций на термотропное поведение и ионную проницаемость липидных мембран. Обнаружено, что физическое состояние липидных мембран изменяется в присутствии исследуемых препаратов в зависимости от рН среды и молекулярного веса применяемых фракций гуминовых кислот. Наиболее эффективно с гидрофобной областью липидного бислоя взаимодействует низкомолекулярная фракция натриевых солей гуминовых кислот (рис. 1). Исследуемые препараты вызывают латеральное разделение фаз в липидном бислое и изменение структуры липидных мембран.

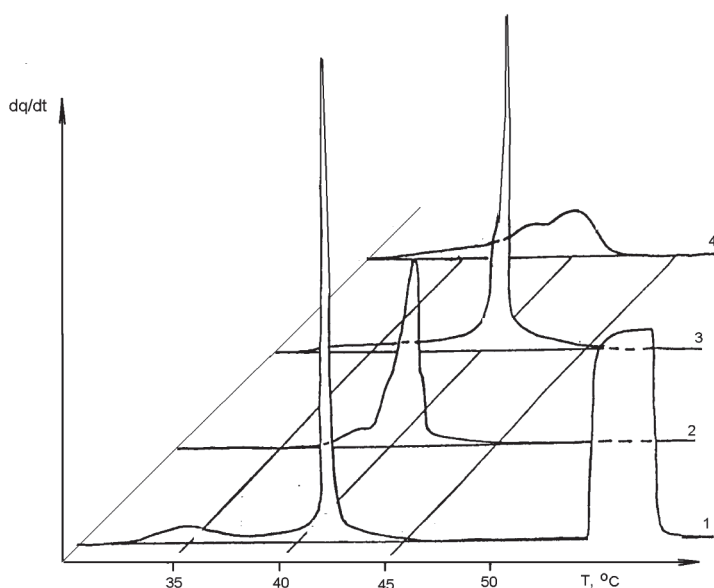


Рис. 1 – Термотропный фазовый переход мультиламеллярных липосом из ДПФХ (1) и в присутствии 0.025%-ных растворов суммарного препарата гумата натрия (2), высокомолекулярной (3) и низкомолекулярной (4) фракций гумата натрия в 150 mM NaCl и 10 mM Hepes-NaOH, pH 8.0. Концентрация липида в калориметрической ячейке 0.1 мг/мл

В слабощелочной среде низкомолекулярная фракция более эффективно снижает энтальпию и кооперативность перехода, чем высокомолекулярная фракция. В присутствии высокомолекулярной фракции кооперативность перехода остается высокой. Обнаружено, что в слабокислой среде низкомолекулярная фракция более эффективно уменьшает энтальпию и кооперативность основного фазового перехода, чем в нейтральной и слабощелочной.

Суммарный препарат натриевых солей гуминовых кислот и его низкомолекулярная и высокомолекулярная фракции увеличивают ионную проницаемость бислойных мембран, образуя в них каналоподобные структуры. Интегральная проводимость таких мембран в 0.1 М NaCl в присутствии суммарного препарата и высокомолекулярной фракции гуминовых кислот увеличивается в 20–30 раз, низкомолекулярной фракции – в 170 раз по сравнению с немодифицированными мембранами (рис. 2). Обнаружено, что низкомолекулярная фракция проявляет более высокую активность и увеличивает проводимость БЛМ в слабокислой среде более эффективно, чем в нейтральной и слабощелочной среде.

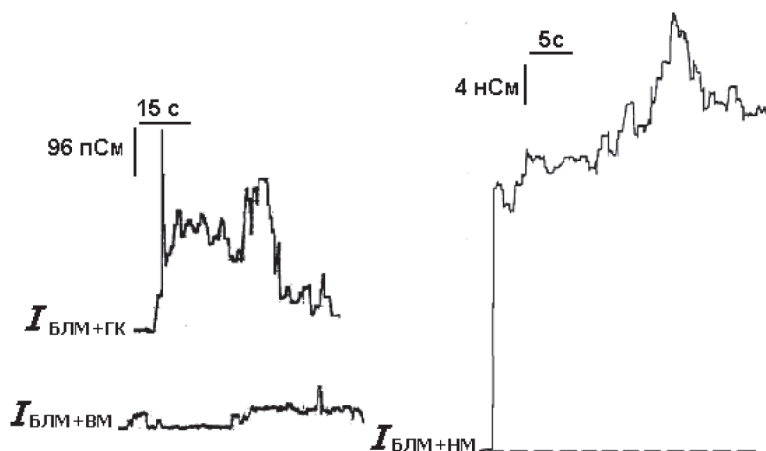


Рис. 2 – Запись тока через моноолеиновые бислойные липидные мембраны (БЛМ) в присутствии 0.0001 мг/мл суммарного препарата гумата натрия ($I_{\text{БЛМ+ГК}}$), высокомолекулярной фракции ($I_{\text{БЛМ+ВМ}}$) и 0.0005 мг/мл низкомолекулярной фракции ($I_{\text{БЛМ+НМ}}$), 10 mM Hepes-NaOH, pH 8.0

Эти факты хорошо согласуются с литературными данными. Так, в основе механизма стимулирующего действия препаратов гуминовых кислот, по мнению некоторых авторов, лежит их способность модифицировать функциональные свойства мембран путем изменения их проницаемости для ионов [11–13]. Эксперименты на модельных мембранах показали, что изменение их ионной проницаемости под действием гуматов натрия происходит за счет образования в них каналоподобных структур. Это увеличивает пассивную проницаемость клеточных мембран для некоторых ионов [13].

Выполненные нами исследования молекулярных механизмов действия основных компонентов биопрепарата ДВ–47–4 (натриевых солей гуминовых кислот и суммы тритерпеновых гликозидов каулозидов) могут быть использованы для создания новых вариантов биопрепаратов с улучшенными, по сравнению с ДВ–47–4, свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментальных работ и полевых испытаний показано, что биопрепарат ДВ–47–4 стимулирует рост проростков семян и продуктивность ряда сель-

скохозяйственных культур, в том числе огурцов, томатов, перца сладкого, гречихи и сои. Он повышает устойчивость растений к фитопатогенным грибам, и вызванными ими заболеваниями растений, в том числе септориозу, пероноспорозу, церкоспорозу, а также к некоторым бактериозам. Препарат ДВ–47–4 оказывает стимулирующее действие на рост и развитие посадочного материала плодовых культур и семян кедр корейского. Установлены некоторые аспекты молекулярных механизмов мембранотропного действия основных компонентов препарата (солей гуминовых кислот и три-терпеновых гликозидов каулозидов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Логачев В.В., Анисимов М.М., Богуславский В.М. // Международные научные чтения, посвященные 10-летию со дня основания ТАНЭБ, 14-17 апреля 2005 г. Владивосток. С. 181–183.
2. Анисимов М.М., Логачев В.В., Демина Е.А. Ващенко А.П., Дега Л.А., Клыков А.Г., Моисеенко Л.М. // Межд. научн. чтения «Приморские зори – 2007». Владивосток. Вып. 1. С. 164–167.
3. Заостровных В., Исакова М., Дедкова О., Анисимов М. // Главный агроном. 2011. № 5. С. 68–70.
4. Ващенко А.П., Дега Л.А., Логачев В.В., Демина Е.А., Анисимов М.М. // Сельскохозяйственная биология. 2008. № 3. С. 110–114.
5. Моисеенко Л.М., Клыков А.Г., Педоченко В.Ф., Тимошинов Р.В., Анисимов М.М., Чайкина Е.Л. // Вестн. РАСХН. 2009. № 3. С. 53–55.
6. Демина Е.А., Анисимов М.М., Логачев В.В., Заварухин М.А. // Тез. докл. рег. научн. конф. “Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии”. 2004, Владивосток. С. 46–47.
7. Демина Е.А., Анисимов М.М. // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 5. С. 113–117.
8. Логачев В.В., Анисимов М.М., Золотарёва Е.В., Федотова О.В., Заостровных В.И., Трофимова Т.Ф., Ващенко А.П. // Защита и карантин растений. 2010. № 6. С. 36–37.
9. Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н. // Труды ДальНИИСХ, г. Хабаровск. 2001. Т. 2. С. 95–103.
10. Овчинникова Т.Ф., Кудряшов А.П., Мажуль В.М., Наумова Г.В., Райцина Г.И. // Биол. науки. 1991. № 10. С. 103–109.
11. Mallevialle J., Anselme C., Marsigny O. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 178.
12. Varanini Z., Pinton R., Debiase M.G., Astolfi S., Maggioni A. // Plant Soil. 1993. V. 153. P. 61–69.
13. Yang H.L., Lu F.J., Wung S.L., Chiu H.C. // Thrombosis Homeostasis. 1994. V. 71. P. 325–330.
14. Комиссаров И.Д., Логинов Л.Ф. // Гуминовые вещества в биосфере. / Ред. Орлов Д.С. М.: Изд-во МГУ. 1993. С. 36–45.
15. Орлов Д.С., Демин В.В., Завгородняя Ю.А. // Докл. РАН. Сер. биол. 1997. Т. 354, № 6. С. 843–845.
16. Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н., Прокофьева Н.Г., Стехова С.И., Шенцова Е.Б., Стригина Л.И. // В кн. Успехи в изучении природных соединений / Владивосток. Дальнаука. 1999. С. 124–140.
17. Лихацкая Г.Н. Тriterпеновые и стероидные гликозиды и мембраны. Молекулярные механизмы взаимодействия гликозидов с мембранами // Владивосток. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2011. 115 с.
18. Анисимов М. М., Стригина Л. И., Горовой П. Г., Аминин Д. Л., Агафонова И. Г. // Раст. ресурсы. 2000. Т. 36, вып. 1. С. 107–129.

КОНТРОЛЬНО-АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ: ОТ АНАЛИТИЧЕСКИХ РАБОТ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА

Н.П. Красовская¹

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159.*

В статье приводится краткая информация о направлении работы контрольно-аналитической лаборатории

Ключевые слова: *методы анализа, аналитические работы, контроль качества.*

Laboratory of Control and Analytic Methods: from analytical works to quality control.
*N.P. Krasovskaya (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch,
Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Russia)*

In the article, a summary of the works of the Laboratory of Control and Analytic Methods is given

Keywords: *analytic methods, analytical works, quality control.*

Контрольно-аналитическая лаборатория является структурным подразделением Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН и отвечает за контроль и качество лекарственных препаратов и биологически активных добавок, разработанных и выпускаемых институтом.

Аналитическая группа была создана в 1960 г. и входила в состав химического отдела Дальневосточного филиала Сибирского Отделения АН СССР, находившегося на улице Ленинская, 50. В 1964 г. по постановлению Президиума Академии наук СССР был образован Институт биологически активных веществ, и группа вошла в его состав. Руководителем аналитической группы была назначена Глебоко Люция Игнатьевна. В октябре 1967 г. группа была преобразована в лабораторию органического микроанализа Института биологически активных веществ ДВ филиала СО АН СССР.

В лаборатории выполнялся обширный круг аналитических работ. В институте в это время велись работы по установлению структур биологически активных веществ, выделяемых из объектов дальневосточной флоры и фауны, среди которых ведущие места занимали женьшень и элеутерококк из семейства аралиевых.

Для структурных работ необходимо было поставить известные классические методы анализа (определение углерода, водорода, азота, фосфора, серы, метоксильных, ацетильных, карбонильных групп, общего азота по Кьельдалю, воды по Фишеру), результаты которых помогали в установлении строения выделяемых соединений. Но наряду с этим в лаборатории начали разрабатывать новые, достаточно специфические методы определения как суммарных компонентов в сложных биологических объектах, так и отдельных соединений.

¹ Автор для связи (тел. (423) 231-11-98; эл. почта: analytic@piboc.dvo.ru).

Направлением научной деятельности лаборатории явились совместные работы с другими лабораториями по разработке методов анализа многокомпонентных систем, которые в последующем послужили основой для разработки Технических условий на биологически активные добавки и стандартов качества для Фармакопейных статей на лекарственные препараты, разрабатываемые в институте.

В составе лаборатории в те годы работали Ульякина Жанна Ивановна, Кошелева Любовь Павловна, Глебоко Люция Игнатьевна, Самошина Надежда Федоровна.

В начале семидесятых годов в лабораторию пришли Павленко (Гюппенен) Галина Федоровна, Василенко Идея Анатольевна, Покушалова Татьяна Викторовна, Ильченко Галина Яковлевна, Зинова Светлана Викторовна, Сыромолотова Наталья Николаевна, Бережневская Людмила Ивановна, Разумная Ольга Митрофановна.

По методам функционального анализа, разработанным для изучения строения гуминовых кислот, была защищена кандидатская диссертация Глебоко Л.И. и выпущен сборник «Новые методы исследования гуминовых кислот» [1]. Этот сборник до сих пор популярен среди ученых, интересующихся гуминовыми кислотами, т.н. веществами плодородия.

С получением таких приборов, как С,Н,N- и аминокислотный анализаторы, газовые и жидкостной хроматографы, работы в лаборатории поднялись на новый, по тем временам современный, уровень, но и старые классические методы не отодвигались в сторону и всё ещё оставались востребованы.

Совместно с лабораторией химии углеводов были разработаны методы определения урановых кислот и сульфатных групп в углеводах и углеводсодержащих биополимерах с использованием газовой и газожидкостной хроматографий [2].

Результаты совместной научной деятельности лаборатории органического микроанализа с другими подразделениями института стали основой для разработки серий биологически активных добавок и новых лекарственных препаратов.

Переход к разработке и выпуску препаратов требовал перестройки работы аналитической службы института. Появление в институте технологического участка, а затем и Опытно-экспериментальной установки позволяло выпускать не только экспериментальные образцы, но и наладить производство полноценных лекарственных препаратов, а для этого необходимо было разрабатывать нормативную документацию.

С выходом Федеральных законов «О техническом регулировании» и «Об обращении лекарственных средств», требующих жесткого контроля не только за качеством готовой продукции, но и за качеством сырья и всех полупродуктов, возникающих в процессе производства, резко повысились требования и к аналитическим службам. В результате лаборатория органического микроанализа сначала вошла в состав лаборатории структурно-аналитических методов исследования как контрольно-аналитическая группа, а затем, после реорганизации, выделилась в Контрольно-аналитическую лабораторию.

Теперь в обязанности лаборатории входило: разработка нормативно-технической документации на препараты; обеспечение качества и контроль качества выпускаемой продукции; контроль качества исходных (сырья) и вспомогательных реагентов, промежуточных полупродуктов; контроль качества в соответствии с нормативной документацией конечного продукта; установление стабильности препаратов при хранении; установление сроков годности препаратов; оформление нормативно-технической документации, сопровождающей весь процесс производства в соответствии с требова-

ниями Госстандарта и Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития.

Первые пакеты нормативно-технической документации (Фармакопейные статьи предприятия) были разработаны для препаратов «Гистохром®» и «Максар®»: «Эхинохром – субстанция»; «Эхинохром – стандартный образец»; «Гистохром® раствор 10 мг/мл для внутривенного введения»; «Гистохром® раствор для инъекций 0.02%»; «Маакии амурской древесины»; «Маакии амурской экстракт сухой»; «Максар® таблетки покрытые пленочной оболочкой» [3-9]. Все препараты успешно прошли экспертизу в «Научном центре экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, были утверждены и внесены в Государственный реестр лекарственных средств. К настоящему времени Фармакопейные статьи прошли перерегистрацию и срок их действия продлен ещё на 5 лет. На опытно-экспериментальной установке при непосредственном контроле со стороны лаборатории успешно проходит наработка субстанций для лекарственных препаратов серии «Гистохром®» и препарата «Максар®».

Разработанная совместно с сотрудниками лаборатории химии ферментов нормативная документация на серию биологически активных добавок на основе фукоидана, выделяемого из водоросли *Fucus evanescens*, позволила наладить выпуск БАДов «Фуколам» и «Фуколам – Экстра», которые пользуются спросом.

В последнее время в лаборатории ведется работа по совершенствованию методов контроля качества продуктов и полупродуктов, используемых при производстве субстанции для нового лекарственного препарата «Кумазид®» на основе гликозидов из кукумарии японской. Кроме этого, подготовлен пакет нормативной документации, необходимой при проведения экспертизы в «Научном центре экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России для регистрации нового лекарственного средства. После соответствующих замечаний и изменения правил и требований, этот пакет документов в настоящее время обновляется и дополняется.

Техническая компетентность лаборатории и квалификация сотрудников подтверждены Свидетельствами от Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии России (№ 64 от 26 ноября 2009 г.; № 70 от 19 ноября 2012 г.) и Аттестатом от Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (№ КК-0028-05).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новые методы исследования гуминовых кислот / ред. Еляков Г.Б. Владивосток: изд. ДВНЦ. 1972. 135 с.
2. Кошелева Л.П., Глебо Л.И. Определение содержания уроновых кислот и сульфатных групп в полисахаридах газохроматографическим методом. / Химия природ. соедин., 1977, № 4, С.500–502.
3. «Эхинохром – субстанция», ФСП Р N002362/01-291209, изм. № 1; изм. № 2.
4. «Гистохром® раствор для внутривенного введения 10 мг/мл», ФСП Р N002363/01-040411.
5. «Гистохром® раствор для инъекций 0.02%», Р №002363/02-2003, ФСП 42-0170-2813-02.
6. «Эхинохром- образец стандартный», Р №002362/02-2003; ФС 42-0086-02.
7. «Маакии амурской древесины (ангро)», ФСП Р N003286/01-180711.
8. «Маакии амурской экстракт сухой», ФСП Р N003309/01-110711.
9. «Максар® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 60 мг», ФСП Р N003294/01-040411.

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ ТИБОХ ДВО РАН

Н. И. Стадниченко¹

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159*

В статье приводятся данные об интеллектуальной собственности Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (более 300 изобретений), созданной его сотрудниками за 50 лет. В настоящее время Институт является собственником 107 действующих патентов на изобретения и 11 свидетельств на товарные знаки. Краткая информация о наиболее значимых изобретениях, относящихся как к новым технологиям получения биологически активных продуктов из отходов переработки марикультуры, океанического и растительного сырья, так и к новым уникальным препаратам для медицины, сельского хозяйства, ветеринарии представлена.

Ключевые слова: *изобретение, товарный знак, ноу-хау, патент.*

The intellectual property of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS. *N. I. Stadnichenko*¹ (G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 690022, prosp. 100 let Vladivostoku, 159, Russia).

Data on intellectual property of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (more than 300 inventions) created by his scientists in 50 years are given. At present, the institute is the owner of 107 valid patents on inventions and 11 certificates on trademarks. Summary of the most significant inventions relating as to new technologies of obtaining biologically active products from mariculture waste, oceanic and vegetant raw materials, and to new unique preparations for medicine, agriculture, veterinary medicine is presented.

Keywords: *invention, trade mark, know how, patent.*

ВВЕДЕНИЕ

Изобретения, ноу-хау, товарные знаки и другие объекты интеллектуальной собственности (ИС) считаются основой прогрессивного развития любой экономики. Такую собственность следует рассматривать как важный ресурс, который при определенных условиях может стать реальным фактором экономического развития научно-исследовательских организаций, вузов и страны в целом.

Администрация ТИБОХ ДВО РАН, сознавая стратегическую важность интеллектуальной собственности, старается, несмотря на финансовые трудности, осуществлять политику сохранения и развития ее потенциала. Деятельность в области создания и правовой охраны объектов ИС имеет целью обеспечить институту достойное место на рынке наукоемких продуктов и технологий.

Интеллектуальная собственность — одна из форм имущества, которому, как и всякому имуществу, нужна охрана. Правовая охрана обеспечивает закрепление за институтом прав собственности на конкретные результаты интеллектуальной деятель-

¹ Автор для связи (+7 (423)231-16-44; эл. почта: nstادن@piboc.dvo.ru).

ности, что, в свою очередь, создает правовую основу (исключительное право) для введения объектов интеллектуальной собственности в хозяйственный оборот.

Опыт изобретательской и патентно-лицензионной работы в ТИБОХ ДВО РАН насчитывает более 40 лет. Патентный отдел в институте был создан в 1971 г. и послужил активному развитию его изобретательской деятельности.

Патентный отдел является самостоятельным структурным научно-вспомогательным подразделением, подчиняется директору и проводит свою работу во взаимодействии с научными и научно-производственными структурами института, а также с финансово-экономическим отделом, группой маркетинга и сбыта. Отдел, в лице одного сотрудника, осуществляет аналитическую, экспертную, правовую функции, участвует в принятии решений о владении, использовании и распоряжении правами института на результаты интеллектуальной деятельности (РИД).

Институтом накоплен значительный потенциал ИС: создано около 300 изобретений в области химии, биотехнологии, микробиологии и медицины, он является собственником 107 действующих патентов на изобретения, 11 свидетельств на товарные знаки и 4 ноу-хау.

Изобретательская активность научных и инженерно-технических сотрудников Института достаточно высока – около 70% от их общей численности являются авторами изобретений, причем многие – неоднократно. Этому в немалой степени способствует выплата авторам изобретений единовременного поощрительного вознаграждения за создание изобретений и вознаграждения за их использование.

Лидирующую группу изобретателей представляют д.б.н. Артюков А.А. (более 50 изобретений), д.х.н. Козловская Э.П. (40 изобретений), академик Стоник В.А. (более 30 изобретений), к.б.н. Рассказов В.А. (30 изобретений), д.х.н. Звягинцева Т.Н. (более 25 изобретений), д.х.н. Федореев С.А. (20 изобретений), к.х.н. Мищенко Н.П. (17 изобретений), к.х.н. Шевченко Н.М. (более 15 изобретений), н.с. Купера Е.В. (15 изобретений).

Основной целью прикладных работ, проводимых в институте, является разработка научных основ для развития на Дальнем Востоке России современной отрасли промышленности по производству лекарственных и ветеринарных средств, биопрепаратов, пищевых добавок из уникального возобновляемого биологического сырья. Для этого в лабораториях института ведутся работы в области создания новых ресурсосберегающих технологий получения биологически активных веществ и продуктов на их основе из отходов переработки марикультуры, океанического и растительного сырья. Созданы уникальные и уже апробированные на практике препараты для медицины, сельского хозяйства, ветеринарии, а также новые лечебно-профилактические безалкогольные напитки и пищевые добавки.

Разработки института высокотехнологичны, экологически безопасны, малоэнергоёмки, их создание базируется, в основном, на использовании сырьевых ресурсов Дальнего Востока. Эти и другие характеристики обеспечивают их высокую конкурентоспособность как на отечественном, так и зарубежных рынках.

Основные направления изобретательской деятельности ТИБОХ

1. Биотехнологические способы получения физиологически активных веществ, средств и препаратов морского и наземного происхождения. С их помощью в последние годы получены:

- препарат кукумариовит, обладающий гепатопротекторным действием, предотвращающим перерождение ткани до стадии фиброза и цирроза печени, продукт переработки ценного биологического сырья – дальневосточной промысловой голотурии *Cucumaria japonica* [1];

- коллагеновый препарат апостатин, обладающий антикоагулянтным и противоопухолевым действием, получен обработкой кожно-мышечного мешка голотурии *Apostichopus japonicus* комплексом протеолитических ферментов [2]. Препарат нетоксичен и может оказаться полезным для профилактики и дополнительной терапии при онкологических заболеваниях;

- каротиноидный комплекс, содержащий астаксантин, лютеин и зеаксантин, обладающий расширенным спектром биологической активности, получен с высоким выходом из морских звезд *Patiria pectinifera* [3];

- каррагинаны, используемые как в комплексной терапии социально-значимых болезней, так и в качестве пищевых ингредиентов или добавок для пищевой промышленности, получены при переработке красных водорослей *Tichocarpus crinitus* и *Chondrus armatus* [4];

- индивидуальные препараты кислых и нейтральных полисахаридов и комплекс низкомолекулярных биологически активных соединений, которые могут найти применение в медицине и косметологии [5], а также разные по химической природе биологически активные вещества высокой степени чистоты (фукоксантин, хлорофиллы, глицерогликолипиды, альгинаты [6]), получены с высокими выходами при комплексной переработке бурых водорослей;

- розмариновая кислота, природный антиоксидант, обладающий иммуносупрессорным действием и проявляющий противовирусную и антилейкозную активность, и 7,3'-дисульфат лютеолина, обладающий канцерпревентивным действием и противовирусной активностью, выделяются в значительных количествах при полупромышленном способе обработки морских трав семейства *Zosteraceae* [7, 8].

2. Создание средств, обладающих биологически активными свойствами:

- препарат КД – средство, обладающее профилактическим и лечебным действием при заражении вирусом клещевого энцефалита, представляющее собой смесь тритерпеновых гликозидов из отвара голотурии *Cucumaria japonica* [9], которое ранее было известно как иммуно- и биостимулятор. Данное изобретение вошло в базу Роспатента «100 лучших изобретений России»;

- средства, стимулирующие апоптоз клеток лейкемии человека, были созданы на основе синтетических производных О- и S-гликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) [10] и тритерпеновых гликозидов из голотурий [11]. Средства не оказывают воздействия на нормальные клетки иммунной системы человека (нейтрофилы);

- фукоидан из *Fucus evanescens*, стимулирующий созревание дендритных клеток, может найти применение в онкологии [12];

- средства, предотвращающие трансформацию нормальных клеток млекопитающих в опухолевые. К ним относятся аналог ааптамина, 3-N-морфолинил-9-деметилюксааптамин, полученный из губки *Aaptos sp.*, (оказывает раково-профилактическое действие в нетоксичных для нормальных клеток концентрациях) [13], и 3-бромифаскаплизин (оказывает раково-превентивное действие в нецитотоксических для нормальных клеток концентрациях и может найти применение в онко-

логии, а также в научных исследованиях в области клеточной и молекулярной биологии) [14].

3. *Отбор и культивирование штаммов бактерий, грибов и каллусных клеток, продуцирующих полезные вещества:*

- штамм бактерий *Pseudoalteromonas issachenkonii* КММ 3549^T – продуцент фукоидан-гидролазы [15];
- штамм культивируемых клеток растений *Rubia cordifolia* L. – продуцент антрахинонов [16];
- штамм гриба *Phoma glomerata* – продуцент полисахарида, обладающего иммуномодулирующей активностью [17];
- штамм гриба *Trichoderma aureoviride* Rifai – продуцент 1,3-β-D-глюканаз [18].

4. *Разработка генно-инженерных и других биотехнологических методов получения природных полимеров морских организмов, включая ферменты, другие полипептиды, полисахариды, лектины.*

•Разработан способ получения рекомбинантной щелочной фосфатазы из морской бактерии *Cobetia marina*. Высокая удельная активность фосфатазы и ее рекомбинантной формы делает их перспективными для применения в генной инженерии (для дефосфорилирования ДНК), гибридизационной технике (для получения конъюгатов с олигонуклеотидами и хемилюминесцентного мечения генов), в медицине (для получения иммуноконъюгатов) [19].

•Сконструирована плаزمида, определяющая синтез α-галактозидазы и способ получения рекомбинантной α-галактозидазы. Изобретение позволяет получать более активную и стабильную рекомбинантную α-галактозидазу с высокой степенью эффективности [20].

•Получены полипептиды из морской анемоны *Heteractis crispa*, обладающие анальгетическим действием за счет блокады боли, связанной с нарушением функциональной активности болевых ионных каналов и рецепторов. Данные полипептиды могут найти применение как в научных исследованиях, так и медицине, конкретно, в нейрофармакологии для конструирования нового поколения высокоспецифичных анальгетиков [21, 22].

5. *Создание препаратов для медицины, ветеринарии, сельского хозяйства и других отраслей.*

•Гистохром® для офтальмологии [23]. Применяется при заболеваниях роговицы глаза для ускорения эпителизации, заболеваниях сетчатки как ретино-протектор при пролиферативных процессах, дегенерациях и гемофтальмах различного генеза, а также при контузиях и проникающих ранениях глаза. Выпускается в лекарственной форме «Гистохром® раствор для инъекций 0.02%». В отношении результата интеллектуальной деятельности «Получение готовой лекарственной формы «Гистохром® раствор для инъекций 0.2 мг/мл» в институте введен режим коммерческой тайны. С 2007 г. по 2010 г. выпущено около 100 тысяч упаковок препарата для офтальмологии.

•Гистохром® для кардиологии [24]. Применяется в кардиологии для лечения ишемии и инфаркта миокарда в острой фазе, а также для профилактики реперфузионных повреждений у больных инфарктом миокарда. Выпускается в лекарственной форме «Гистохром® раствор для внутривенного введения 10 мг/мл». В отношении

результата интеллектуальной деятельности «Получение готовой лекарственной формы «Гистохром® раствор для внутривенного введения 10 мг/мл» введен режим коммерческой тайны. С 2007 г. по 2010 г. выпущено около 900 упаковок препарата для кардиологии.

Препараты являются оригинальными, им предоставлена патентная охрана не только на территории Российской Федерации, но и США и стран Евросоюза (Великобритания, Франция, Германия, Нидерланды). Препараты серии Гистохром® имеют регистрацию в России с 1999 г. В реестре лекарственных средств зарегистрирована активная субстанция для получения препаратов Гистохром® – эхинохром, способ получения которой защищен патентом РФ [25]. Международное непатентованное название (МНН) – пентагидроксиэтилнафтохинон.

Дальнейшие исследования препарата показали, что Гистохром® обладает выраженным диуретическим действием, по силе которого он не уступает тиазидовым диуретикам, в отличие от последних, он не вызывает гипокалиемии [26].

- Гепатопротекторный препарат Максар® оказывает выраженный терапевтический эффект при острых токсикозах печени и вирусном гепатите [27, 28]). По активности и широте фармакологического действия Максар® является лидером среди известных гепатопротекторов: карсила, легалона, силибора и др. В 2007 г. выпущены четыре промышленные партии препарата Максар®. В настоящее время препарат прошел перерегистрацию в Минздравсоцразвития для подтверждения его эффективности и безопасности, оформляется разрешение на промышленный выпуск препарата.

- Сухой экстракт ядровой древесины мааки амурской предложено применять в качестве антиклиматерического средства [29]. Средство ослабляет психические и вегетососудистые нарушения в климатерический период.

- Предложено новое лекарственное средство, обладающее гемореологическими и антитромбоцитарными свойствами, основой которого является препарат Мааки амурской экстракт сухой [30]. Средство расширяет арсенал антиагрегантных средств растительного происхождения, улучшает реологические свойства крови и обладает одновременно антитромбоцитарным эффектом.

- На основе спиртового экстракта мааки амурской получен препарат, обладающий выраженным гепатопротективным действием. По способности восстанавливать функцию печени животных в условиях интоксикации четыреххлористым углеродом препарат превосходит эталонные гепатопротекторы Максар® и легалон [31].

- Ранозаживляющее средство «Коллагеназа КК®» широкого спектра действия [32]. Комплекс протеолитических ферментов применяется для очищения ран различной этиологии, любых локализаций и в любой стадии раневого процесса. При гнойных ранах способствует быстрой эвакуации нежизнеспособных тканей и экссудата, раннему появлению грануляционной ткани, эпителизации. Совместно с Военно-медицинской академией (г. Санкт-Петербург) успешно проведены дополнительные клинические исследования по изучению возможности применения «Коллагеназы КК®» для лечения склеродермии и рассасывания рубцов [33, 34].

- Иммуномодулирующее средство Кумазид [35]. Препарат обладает низкой цитотоксической активностью и низкой острой токсичностью, не проявляет мутагенной активности, не обладает эмбриотоксическим, тератогенным и гормоно-подобным действием. В малых дозах он стимулирует различные системы клеточного и гуморального иммунитета в опытах *in vitro* и *in vivo*, повышает устойчивость животных к

некоторым патогенным микроорганизмам и сублетальным дозам радиации, обладает способностью тормозить рост злокачественных новообразований у экспериментальных животных.

6. Биологически активные добавки к пище, напитки и другие пищевые продукты.

•Фуколам® – биологически активный продукт, содержащий полисахаридную композицию, полученную из водоросли *Fucus evanescens* и состоящую из фукоидана и полиманнуроновой кислоты. На основе продукта разработана серия БАД к пище, которые разрешены для реализации населению через аптечную сеть и специализированные магазины, а также разработаны композиции ингредиентов для напитков и косметическое средство для наружного применения [36].

•Каррагинан повышает неспецифическую сопротивляемость организма к действию эндотоксинов грамотрицательных бактерий и проявляет свойства пребиотика, эффективно стимулируя рост полезной микрофлоры кишечника и ограничивая размножение патогенных бактерий [37]. Разработана соответствующая БАД.

•Коуропитин – гелевая композиция, обладающая ранозаживляющим, противовоспалительным, гепатопротекторным, противодиабетическим и противоопухолевым действием, содержащая триптантрин и хитозан [38].

•Бальзамы серии «Гербамарин» (общеукрепляющий, гепатозащитный кардиопротекторный, антидиабетического действия) [39, 40]. Основу бальзамов составляют биологически активные вещества, выделяемые из уникальных лекарственных растений и морских организмов Дальнего Востока. Они рекомендованы Институтом питания Минздрава России как пищевые добавки. Входят в число 100 лучших товаров России и награждены медалями на международных выставках. Гербамарины выпускается в двух формах: таблетки и безалкогольный бальзам. Производство последнего организовано на заводах АО «Уссурийский бальзам».

•Кисломолочный и безалкогольный напитки, содержащие фуколам и/или каррагинан. Композиции выполняют функции энтеросорбентов токсинов, регулируют обмен веществ, снижают уровень холестерина в крови [41, 42].

•Композиции для приготовления теста для хлеба пшеничного и полуфабриката мясного, содержащие фуколам [43, 44].

7. Способы диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний.

В ТИБОХ ДВО РАН (совместно с соисполнителями из ТГМУ, ИБМ ДВО РАН) разработан ряд новых способов профилактики, диагностики и лечения различных заболеваний:

•профилактика лучевого пневмонита с использованием препарата неомитилан [45], приводящая к 40%-ному уменьшению толщины альвеолярной стенки легочной ткани, и, следовательно, снижению патофизиологического действия радиотерапии на здоровые ткани онкобольных [46];

•диагностика иерсиниоза и набор для её осуществления повышают эффективность диагностики кишечного иерсиниоза, так как позволяют определять в сыворотке крови человека специфические антитела к *Yersinia enterocolitica* всех серовариантов как в ранние (на 1-й неделе заболевания), так и в более поздние сроки заболевания (на 2-й и 3-4-й неделях) [47];

- дифференциальная диагностика псевдотуберкулеза от иерсиниоза и диагностический набор на псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз позволяют выявлять случаи смешанной формы иерсиниозной инфекции [48];

- диагностика рака шейки матки, позволяющая выявлять заболевание на доклинических этапах при отрицательных результатах других видов обследования, формировать группы риска по развитию рака шейки матки и осуществлять динамический мониторинг состояния эпителия шейки матки у женщин, входящих в группы риска [49];

- лечение хронических гонорейных и гонорейно-бактериальных уретритов с использованием липосомной формы кларитромицина, обеспечивающее предотвращение рецидивов заболевания, снижение побочных эффектов и осложнений [50]. Изобретение создано в рамках проекта «Наноразмерные высокоэффективные препараты для терапии заболеваний разной этиологии»;

- прогнозирование повышения индивидуального риска возникновения хронической обструктивной болезни легких, ассоциированной с ишемической болезнью сердца, до развития патологического процесса или на ранних стадиях заболевания [51];

- детекция бактерий рода *Yersinia* и дифференциация патогенных для человека видов иерсиний методом мультиплексной полимеразной цепной реакции для диагностики острых и хронических форм инфекций, вызываемых этими микроорганизмами; в ветеринарной практике для выявления инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, вызываемых иерсиниями, и бактерионосителей; для определения бактериальной обсемененности иерсиниями эпидемиологически значимых объектов (тепллиц, овощехранилищ, пищеблоков и т.п.) [52]. Данное изобретение включено в базу Роспатента «Перспективные изобретения».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стоник В.А., Агафонова И.Г., Аминин Д.Л. и др. // патент № 2426453, опубл. 20.08.2011. Бюл. № 23.
2. Попов А.М., Артюков А.А., Глазунов В.П. и др. // патент № 2302250, опубл. 10.07.2007. Бюл. № 19.
3. Артюков А.А., Руцкова Т.А., Купера Е.В. и др. // патент № 2469732, опубл. 20.12.2012. Бюл. № 35.
4. Барабанова А.О., Ермак И.М., Хоменко В.А. и др. // патент № 2428999, опубл. 20.09.2011. Бюл. № 26.
5. Шевченко Н.М., Имбс Т.И., Кусайкин М.И. и др. // патент № 2240816, опубл. 27.11.2004. Бюл. № 33.
6. Герасименко Н.И., Бусарова Н.Г., Козловская Э.П. // патент № 2399298, опубл. 20.09.2010. Бюл. № 26.
7. Артюков А.А., Купера Е.В., Руцкова Т.А. и др. // патент № 2401827, опубл. 20.10.2010. Бюл. № 29.
8. Артюков А.А., Кочергина Т.Ю., Руцкова Т.А. и др. // патент № 2432960, опубл. 10.11.2011. Бюл. № 31.
9. Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А. и др. // патент № 2242238, опубл. 20.12.2004. Бюл. № 35.
10. Федоров С.Н., Полоник С.Г., Шубина Л.К. и др. // патент № 2372919, опубл. 20.11.2009. Бюл. № 32.

11. Федоров С.Н., Шубина Л.К., Капустина И.И. и др. // патент № 2360692, опубл. 10.07.2009. Бюл. № 19.
12. Звягинцева Т.Н., Ермакова С.П., Кусайкин М.И. и др. // патент № 2361598, опубл. 20.07.2009. Бюл. № 20.
13. Дышловой С.А., Шубина Л.К., Федоров С.Н. и др. // патент № 2429840, опубл. 27.09.2011. Бюл. № 27.
14. Кузьмич А.С., Федоров С.Н., Шубина Л.К. и др. // патент № 2429839, опубл. 27.09.2011. Бюл. № 27.
15. Бакунина И.Ю., Иванова Е.П., Звягинцева Т.Н. и др. // патент № 2207370, опубл. 27.06.2003. Бюл. № 18.
16. Мищенко Н.П., Федореев С.А., Глазунов В.П. и др. // патент № 2141525, опубл. 20.11.1999. Бюл. № 32.
17. Пивкин М.И., Белогорцева Н.И., Лукьянов П.А. // патент № 2312148, опубл. 10.12.2007. Бюл. № 34.
18. Пивкин М.В., Бурцева Ю.В., Сова В.В. и др. // патент № 2422507, опубл. 27.06.2011. Бюл. № 18.
19. Балабанова Л.А., Рассказов В.А. // патент № 2447151, опубл. 10.04.2012. Бюл. № 10.
20. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю. и др. // решение о выдаче патента на изобретение от 20.09.2013 по заявке № 2012142209.
21. Монастырская М.М., Чаусова В.Е., Гладких И.Н. и др. // патент № 2415866, опубл. 10.04.2011. Бюл. № 10.
22. Козловская Э.П., Монастырская М.М., Гладких И.Н. и др. // патент № 2475497, опубл. 20.02.2013. Бюл. № 5.
23. Еляков Г.Б., Максимов О.Б., Мищенко Н.П. и др. // патент № 2134107, опубл. 10.08.1999. Бюл. № 22.
24. Еляков Г.Б., Максимов О.Б., Мищенко Н.П. и др. // патент № 2137472, опубл. 20.09.1999. Бюл. № 26.
25. Артюков А.А., Купера Е.В., Кольцова Е.А. и др. // патент № 2283298, опубл. 10.09.2006. Бюл. № 25.
26. Федореев С.А., Мищенко Н.П., Кулеш Н.И. и др. // патент № 2408367, опубл. 10.01.2011. Бюл. № 1.
27. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Федореев С.А. и др. // патент № 2104027, опубл. 10.02.1998. Бюл. № 4.
28. Гайсаев Р.О., Белобородова Э.И., Саратиков А.С. // патент № 2175237, опубл. 27.02.2000. Бюл. № 30.
29. Федореев С.А., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П. и др. // патент № 2398592, опубл. 10.09.2010. Бюл. № 25.
30. Федореев С.А., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П. и др. // патент № 2342944, опубл. 10.01.2009. Бюл. № 1.
31. Кулеш Н.И., Федореев С.А., Веселова М.В. и др. // патент № 2454243, опубл. 27.06.2012. Бюл. № 18.
32. Козловская Э.П., Артюков А.А., Козловский А.С. и др. // патент № 2093166, опубл. 20.10.1997. Бюл. № 29.
33. Козловская Э.П., Артюков А.А., Козловский А.С. и др. // патент № 2286162, опубл. 27.10.2006, Бюл. № 30.
34. Козловская Э.П., Артюков А.А., Козловский А.С. и др. // патент № 2286791, опубл. 10.11.2006. Бюл. № 31.
35. Стоник В.А., Аминин Д.Л., Богуславский В.М. и др. // патент № 2271820, опубл. 20.03.2006. Бюл. № 8.
36. Шевченко Н.М., Имбс Т.И., Кусайкин М.И. и др. // патент № 2315487, опубл. 27.01.2008. Бюл. № 3.
37. Ермак И.М., Барабанова А.О., Соловьева Т.Ф. и др. // патент № 2351351, опубл. 10.04.2009. Бюл. № 10.

38. Стоник В.А., Попов А.М., Гафуров Ю.М. и др. // патент № 2366408, опубл. 10.09.2009. Бюл. № 25.
39. Гафуров Ю.М., Горовой П.Г., Рассказов В.А. и др. // патент № 2092077, опубл. 10.10.1997. Бюл. № 28.
40. Лоечко Ю.Н., Козловская Э.П., Артюков А.А. и др. // патент № 2093046, опубл. 20.10.1997. Бюл. № 29.
41. Ермак И.М., Шевченко Н.М., Каленик Т.К. и др. // патент № 2375878, опубл. 20.12.2009. Бюл. № 35.
42. Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М., Имбс Т.И. и др. // патент № 2456873, опубл. 27.07.2012. Бюл. № 21.
43. Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Имбс Т.И. и др. // патент № 2399209, опубл. 20.09.2010. Бюл. № 26.
44. Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М., Кусайкин М.И. и др. // патент № 2459436, опубл. 27.08.2012. Бюл. № 24.
45. Молчанова В.И., Чикаловец И.В., Черников О.В. и др. // патент № 2379044, опубл. 20.01.2010. Бюл. № 2.
46. Молчанова В.И., Лукьянов П.А., Гончаров А.В. и др. // патент № 2469731, опубл. 20.12.2012. Бюл. № 35.
47. Вострикова О.П., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. и др. // патент № 2345365, опубл. 27.01.2009. Бюл. № 3.
48. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д. и др. // патент № 2339952, опубл. 27.11.2008. Бюл. № 33.
49. Булгаков А.А., Петрова И.Ю., Родионова О.М. и др. // патент № 2343485, опубл. 10.01.2009. Бюл. № 1.
50. Лукьянов П.А., Сингур О.А., Туркутюков В.Б. // патент № 2429823, опубл. 27.09.2011. Бюл. № 27.
51. Исаева М.П., Невзорова В.А., Тилик Т.В. и др. // патент № 2442165, опубл. 10.02.2012. Бюл. № 4.
52. Исаева М.П. и Стенкова А.М. // патент № 2385941, опубл. 10.04.2010. Бюл. № 10.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Стоник В. А. О наиболее цитируемых научных статьях Инбав-ТИБОХ ДВО РАН.....	7
Кича А.А., Иванчина Н.В., Малайренко Т.В. Полярные стероиды морских звезд: структуры, биологическая активность, биосинтез	15
Макарьева Т.Н. Двухголовые сфинголипиды из морских губок.....	30
Сильченко А.С., Авилов С.А., Калинин В.И. Тритерпеновые гликозиды голотурий: химическая структура, биологическая активность и некоторые закономерности биосинтеза.....	43
Кокоулин М.С., Томищч С.В., Командрова Н.А. О-Специфические полисахариды некоторых представителей морских грамотрицательных бактерий.....	59
Бахолдина С.И., Красицова И.Н., Соловьева Т.Ф. Влияние абиотических факторов на формирование вирулентного фенотипа <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	68
Черников О.В., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Ковальчук С.Н., Лукьянов П.А. Новый класс лектинов из мидий семейства Mytilida	77
Звягинцева Т.Н., Кусайкин М.И., Ермакова С.П., Шевченко Н.М. Полисахариды бурых водорослей и ферменты морских организмов, катализирующие их превращения. Перспективы создания БАД и лекарств на основе полисахаридов и продуктов их трансформации..	84
Реунов А.В., Лапина Л.А., Нагорская В.П., Елякова Л.А., Ермак И.М., Барабанова А.О., Давыдова В.Н., Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М. Ингибирующее действие полисахаридов на развитие вирусных инфекций у растений	99
Молчанова В.И., Чикаловец И.В., Черников О.В., Аминин Д.Л., Попов А.М., Лукьянов П.А. Биологическая активность неомитилана – биогликана из мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>	111
Терентьева Н.А., Рассказов В.А. Нуклеозидкиназы морского ежа и их использование в биоиспытаниях	119
Аминин Д.Л., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Сильченко А.С., Авилов С.А., Калинин В.И. Иммуномодулирующая активность тритерпеновых гликозидов голотурий	130
Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П. Биомедицинские свойства пептидов из морских организмов и перспективы их использования.....	139
Агафонова И.Г. Создание экспериментальных моделей на лабораторных животных, изучение физиологической активности препаратов методом МРТ.....	147
Кривошапко О.Н., Попов А.М., Артюков А.А. Вторичные метаболиты морских организмов как корректоры нарушений липидного и углеводного обмена	158
Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н., Логачев В.В. Биопрепарат ДВ–47–4: применение в растениеводстве и механизм действия.....	165
Красовская Н.П. Контрольно-аналитическая лаборатория: от аналитических работ к контролю качества	172
Стадниченко Н.И. Интеллектуальная собственность ТИБОХ ДВО РАН.....	175

CONTENTS

Preface.....	5
<i>Stonik V.A.</i> About the most quoted scientific articles of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry.....	7
<i>Kicha A.A., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V.</i> Polar steroids from starfish: structures, biological activity, biosynthesis.....	15
<i>Makarieva T.N.</i> Two-headed sphingolipids from marine sponges.....	30
<i>Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A.</i> Triterpene glycosides from sea cucumbers: chemical structure, biological activities and some trends of biosynthesis	43
<i>Kokoulin M. S., Tomshich S.V., Komandrova N.A.</i> O-Специфические полисахариды некоторых представителей морских грамотрицательных бактерий.....	59
<i>Bakholdina S.I., Krasikova I.N., Solov'eva T.F.</i> The impact of abiotic factors on formation of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> virulent phenotype.....	68
<i>Chernikov O.V., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Kovalchuk S.N., Lukyanov P.A.</i> New class of lectins from the mussels of Mytilidae family	77
<i>Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P., Kusaykin M.I., Shevchenko N.M.</i> Polysaccharides of brown algae and marine organisms enzymes, which catalyze their transformation. Prospects of creation of the supplements and drugs based on polysaccharides and products of their transformation. .	84
<i>Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P., Elyakova L.A., Yermak I.M., Barabanova A.O., Davydova V.N., Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M.</i> Inhibitory effects of polysaccharides on the development of virus infection in plants.....	99
<i>Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Aminin D.L., Popov A.M., Lukyanov P.A.</i> Biological activity of neomytilan - bioglycan from the mussels <i>Crenomytilus grayanus</i>	111
<i>Terentyeva N.A., Rasskazov V.A.</i> Nucleoside kinases of sea urchin and their using for bioassaying. .	119
<i>Aminin D.L., Pislyagin E.A., Menchinskaya E.S., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I.</i> Immunomodulatory activity of triterpene glycosides from sea cucumbers.	130
<i>Popov A.M., Krivoschapko O.N., Artyukov A.A., Kozlovskaya E.P.</i> Biomedical properties of peptides from marine organisms and prospects of use.....	139
<i>Agafonova I.G.</i> The creation of experimental animal models. Studying of physiological activity of compounds with MRI	147
<i>Krivoschapko O.N., Popov A.M., Artyukov A.A.</i> Secondary metabolites of marine organisms as proof-readers of abnormal lipid and carbohydrate metabolism.....	158
The biological product DV-47-4: application in plant and mechanisms of action. <i>M. M. Anisimov¹, G. N. Likhatskaya, V. V. Logachev</i>	165
<i>Krasovskaya N.P.</i> Laboratory of Control and Analytic Methods: from analytical works to quality control.	172
<i>Stadnichenko N.I.</i> The intellectual property of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS.	175

Научное издание

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ТИХООКЕАНСКОМ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Г.Б. ЕЛЯКОВА
ДВО РАН

Отв. редактор *И.Н. Красикова*
Художник *Г.П. Писарева*
Оператор набора и верстки *С.В. Мороз*

Подписано к печати 00.00.2013 г.
Бумага мелованная. Формат 70×100/16. Печать офсетная.
Усл.п.л. 00,00. Уч.-изд. л. 00,0. Тираж 200 экз. Заказ 00

Издательство Дальнаука ДВО РАН
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7

Отпечатано в Информационно-полиграфическом
хозрасчетном центре ТИГ ДВО РАН
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7