

DOI: 10.25808/08697698.2019.207.5.012

УДК 547.458; 571.27; 577.11; 577.112.8; 577.114; 577.352.2; 612.017.1; 615.03

В.Н. ДАВЫДОВА, С.И. БАХОЛДИНА, А.В. ВОЛОДЬКО,  
В.И. ГОРБАЧ, И.М. ЕРМАК, А.О. КРАВЧЕНКО,  
Г.А. НАБЕРЕЖНЫХ, О.Д. НОВИКОВА, О.Ю. ПОРТНЯГИНА,  
Е.В. СИДОРИН, Е.В. СОКОЛОВА, В.А. ХОМЕНКО,  
Д.К. ЧИСТЮЛИН, Т.Ф. СОЛОВЬЕВА

## Структурно-функциональное исследование компонентов наружной мембраны бактерий и полисахаридов морских гидробионтов в лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета

*Дан обзор результатов исследований, проведенных в лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета за последние 5 лет. Суммированы данные по изучению структуры и свойств белков наружной оболочки грамотрицательных бактерий: поринов, фосфолипазы A<sub>1</sub>, белка-шаперона Skp; полисахаридов красных водорослей – каррагинанов; хитозана и полиэлектролитных комплексов хитозан–каррагинан.*

*Ключевые слова: белки наружной мембраны, порины, фосфолипаза A<sub>1</sub>, Skp, грамотрицательные бактерии, красные водоросли, каррагинан, хитозан, полиэлектролитные комплексы, эндотоксемия.*

**Structural and functional study of the outer membrane components of bacteria and polysaccharides of marine hydrobionts in the laboratory of molecular bases of antibacterial immunity.** V.N. DAVYDOVA, S.I. BAKHOLDINA, A.V. VOLOD'KO, V.I. GORBACH, I.M. YERMAK, A.O. KRAVCHENKO, G.A. NABEREZHNYKH, O.D. NOVIKOVA, O.Yu. PORTNYAGINA, E.V. SIDORIN, E.V. SOKOLOVA, V.A. KHOMENKO, D.K. CHISTYULIN, T.F. SOLOV'Yeva (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*The paper provides a review of the results of studies carried out in the Laboratory of Molecular Bases of Antibacterial Immunity over the past 5 years. The data of investigation concerning structures and properties of proteins of the outer*

\*ДАВЫДОВА Виктория Николаевна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией, БАХОЛДИНА Светлана Ивановна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ВОЛОДЬКО Александра Викторовна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник, ГОРБАЧ Владимир Иванович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ЕРМАК Ирина Михайловна – доктор химических наук, главный научный сотрудник, КРАВЧЕНКО Анна Олеговна – кандидат химических наук, научный сотрудник, НАБЕРЕЖНЫХ Геннадий Александрович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, НОВИКОВА Ольга Даниилловна – доктор химических наук, главный научный сотрудник, ПОРТНЯГИНА Ольга Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, СИДОРИН Евгений Викторович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, СОКОЛОВА Екатерина Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, ХОМЕНКО Валентина Александровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ЧИСТЮЛИН Дмитрий Константинович – кандидат химических наук, научный сотрудник, СОЛОВЬЕВА Тамара Федоровна – профессор, доктор химических наук, главный научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток).

\*E-mail: vikdavidova@yandex.ru

*shell of gram-negative bacteria: porins, phospholipase A, chaperone Skp; polysaccharides of red algae - carrageenans; chitosan and polyelectrolyte complexes of chitosan-carrageenan are summarized.*

*Key words: outer membrane proteins, porins, phospholipase A, Skp, gram-negative bacteria, red algae, carrageenan, chitosan, polyelectrolyte complexes, endotoxemia.*

Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета (ЛМОАБИ) входит в состав Отдела молекулярной иммунологии, который был образован из лаборатории химии углеводов – одной из первых лабораторий Института биологически активных веществ, позже ТИБОХ ДВО РАН. Толчком к созданию ЛМОАБИ стало освоение новой тематики – исследование О-соматических антигенов грамотрицательных бактерий. С годами круг научных интересов сотрудников лаборатории значительно расширился, и к настоящему моменту работа коллектива связана с исследованием структуры, функциональной и биологической активности таких компонентов наружной оболочки бактерий, как порообразующие белки, белок-шаперон Skp, фосфолипаза A<sub>1</sub> и их рекомбинантные аналоги. Помимо наземных микроорганизмов объектами изучения являются морские бактерии, обладающие уникальными механизмами выживания в среде с пониженной температурой и высоким содержанием солей. В лаборатории продолжают исследования нетоксичных, биосовместимых полисахаридов из морских источников, которые имеют большой потенциал как иммуномодуляторы – средства, повышающие резистентность организма к бактериальным инфекциям, и матрицы для доставки различных лекарственных препаратов.

Среди биологических макромолекул белки не имеют себе равных по каталитическому и регуляторному потенциалу. Это в равной степени относится и к интегральным мембранным белкам, закодированным в 2–3 % генома бактериальной клетки и составляющим около 30 % от общего содержания в ней протеинов. Несмотря на относительную простоту их пространственной организации, мембранные белки выполняют в клетке самые разнообразные функции, являясь структурными компонентами наружной мембраны (НМ) бактерий, диффузионными порами, адгезинами, рецепторами, каналами для транслокации белков, а также ферментами, среди которых обнаружены липазы, протеазы, пальмитоил трансферазы. Выделение и характеристика белков бактериальных мембран с последующим изучением их пространственной структуры и биологических свойств являются основополагающими для понимания взаимосвязи между отдельными компонентами мембран и особенностей их функционирования.

Среди белков НМ бактерий доминируют интегральные β-структурированные белки, так называемые неспецифические порины, предназначенные для пассивной диффузии гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 Да. Они образуют трансмембранные водонаполненные каналы (или поры), которые обеспечивают обмен низкомолекулярными веществами между клеткой и внешним окружением. Кроме того, особенности структуры и поверхностная локализация в клетке обуславливают наличие у бактериальных поринов других свойств, отличных от транспортной функции. Например, экспонированные на поверхности бактериальной клетки участки полипептидной цепи поринов, так называемые петли, являются потенциальными сайтами взаимодействия для функционально важных контактов с другими клетками. С одной стороны, порины представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета макроорганизма, активируя факторы немедленной защиты и включаясь в формирование специфического иммунного ответа, направленного на освобождение от патогена. С другой стороны, они выступают как эффекторы патогенеза, подавляя отдельные стадии иммунной защиты хозяина и обеспечивая выживание патогена в макроорганизме. Это позволяет рассматривать порообразующие белки НМ бактерий как весьма перспективные для решения ряда задач инфекционной иммунологии. Прежде всего следует назвать выявление среди поверхностных бактериальных антигенов веществ, максимально эффективных в качестве компонентов протективных и диагностических препаратов, а также определение «ключевых» для патогенеза молекул с целью разработки и реализации принципиально новых подходов в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний.

Кроме традиционно используемых методов химии белка и физико-химических методов в последние годы значительное место в таких исследованиях стали занимать методы геномной инженерии и компьютерного моделирования. Так, удачное сочетание физико-химических методов, методов молекулярной биологии и компьютерного моделирования позволило выявить генетический полиморфизм OmpC поринов комплекса бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и установить структурные особенности 5 изоформ OmpC, которые различались между собой длиной и аминокислотной последовательностью петли L2. Методами оптической спектроскопии и ДСН-ПААГ-электрофореза показано, что вариабельность в структуре петли L2 обуславливает различия в пространственной структуре и температурной стабильности природных вариантов OmpC белков. Согласно результатам сравнительного моделирования, изоформы OmpC отличаются друг от друга пространственным положением петли L2 и, как следствие, полярными межмономерными контактами, что может оказывать влияние на функциональные свойства порина. Полученные результаты представляют большой интерес для разработки новых антибактериальных препаратов, мишенью которых являются порины [40].

Для выяснения механизма функционирования OmpF-подобного порина из *Y. pseudotuberculosis* (YOmpF) было изучено влияние pH на активность ионного канала белка в планарных липидных бислоях и его связывание с липидными мембранами. Обнаружено, что каналобразующая активность YOmpF чувствительна к действию pH. Подкисление среды снижало проводимость одиночного канала YOmpF и способствовало появлению состояний субпроводимости открытого канала. Однако липидное окружение предохраняло тримерную структуру канала (встроенного при нейтральных значениях pH) от кислотоиндуцированных изменений в функциональных свойствах. Обнаружено, что в этом случае последующее подкисление среды не приводило к резкому снижению поровой активности реконструированного белка. Показано, что в водном растворе при pH 7,0 молекулы YOmpF находятся преимущественно в виде тримеров, в то время как при pH 3,0 – в форме мономеров. Обе молекулярные формы порина имеют высокое сродство к липидной мембране, однако только тримеры белка способны встраиваться в липидный бислой и индуцировать мембранную проводимость. Таким образом, предполагается существование двух состояний мембраносвязанного белка: периферически связанное непроводящее и погруженное в мембрану проводящее состояние. В кислой среде связанные с мембраной мономеры не способны формировать каналобразующие тримеры [35].

Свойства поринов иерсиний, патогенных для человека и животных (в частности *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*), изучаются в лаборатории достаточно давно, однако неспецифические порины *Y. ruckeri* стали новым объектом исследования. Нами установлено, что изолированные OmpF и OmpC порины НМ *Y. ruckeri* в растворах детергентов имеют нагивоподобную структуру и представляют собой  $\beta$ -структурированные мембранные белки, которые по своей пространственной структуре подобны неспецифическим поринам патогенных иерсиний [5, 12] и других энтеробактерий [32]. Сравнение пространственных полноатомных моделей структур OmpC и OmpF поринов *Y. ruckeri* показало, что основные различия наблюдаются в строении внешних петель. В молекулах OmpC и OmpF поринов присутствуют три остатка триптофана, локализация двух из которых консервативна, а положение третьего остатка триптофана в белках разных типов различается. Методом молекулярной динамики нами впервые показано, что различное изменение спектральных характеристик белков при термоденатурации, зафиксированное методами оптической спектроскопии, обусловлено изменением пространственной ориентации одного из остатков триптофана [10].

Для адаптации к изменению условий окружающей среды иерсинии, подобно другим энтеробактериям, наряду с другими факторами используют регулирование биосинтеза неспецифических поринов, формирующих поры с различным диаметром (OmpF и OmpC поринов). Изучение влияния температуры и осмолярности среды культивирования на экспрессию было проведено на примере патогенной для рыб бактерии *Y. ruckeri*. Результаты

исследования показали, что оба фактора важны для переключения биосинтеза этих основных типов неспецифических поринов, однако температура культивирования имела решающее значение. Оптимальными условиями для синтеза OmpF белка оказалось культивирование бактерий при 8 °С в среде, содержащей 150 или 300 мМ NaCl. С другой стороны, для получения максимального выхода OmpC порина при той же концентрации соли в среде требовалось повышение температуры культивирования до 37 °С [22].

Необратимая денатурация мембранных белков в растворах детергентов аналогична разворачиванию водорастворимых мультидоменных белков и представляет собой сложный, многоступенчатый процесс. Порообразующие белки грамотрицательных бактерий представляют собой модифицируемые нагреванием белки, которые изменяют свою молекулярную форму (тримерную или мономерную) и, соответственно, электрофоретическую подвижность в зависимости от условий денатурации. В литературе существуют противоречивые данные об особенностях конформационных изменений в структуре порина под влиянием температуры. Некоторые авторы продемонстрировали потерю тримерной структуры порина только после разворачивания мономерных субъединиц. Другие исследователи первоначально наблюдали диссоциацию пориновых олигомеров в упорядоченные мономеры. Комплексное использование ДСН-ПААГ электрофореза, спектроскопических методов и дифференциальной сканирующей калориметрии позволило провести детальное исследование изменений в пространственной структуре OmpF порина *Y. ruckeri*, вызванных тепловой денатурацией. Полученные данные позволили сделать однозначный вывод о том, что изменения в структуре мономеров OmpF предшествуют диссоциации тримеров порина [33].

Морские бактерии вследствие экстремальных условий обитания сумели развить ряд молекулярных механизмов адаптации, не встречающихся у наземных бактерий. У некоторых морских микроорганизмов под влиянием определенных условий экспрессируются те или иные гены [45], у других обнаружены биоэлектрохимические системы, предназначенные для обеспечения существования бактерий в анаэробных условиях. Нами охарактеризован белковый состав наружной и цитоплазматической (ЦМ) мембран клеточной оболочки психротолерантной морской бактерии *Shewanella frigidimarina* Pi 2-35, выделенной из образца морского льда Амурского залива (Японское море). Обнаружено, что клеточная оболочка этого микроорганизма содержит цитохромы. Состав белков ЦМ не зависит от температуры культивирования бактерий. Пориноподобные белки с молекулярной массой 40 кДа и 34,5 кДа были обнаружены только в НМ бактерий, культивированных при низкой температуре (6–8 °С). С помощью техники БЛМ показано, что оба белка образуют каналы с большей проводимостью, чем порины наземных бактерий. Кроме того, проводимость каналов поринов из *S. frigidimarina* нелинейно зависит от концентрации соли в буфере, что характерно для поринов морских грамотрицательных бактерий [20].

Изучение антигенной структуры и иммунобиологических свойств порообразующих белков НМ грамотрицательных бактерий является важной практической задачей, решение которой связано с созданием новых диагностических тест-систем и вакцинных препаратов. Исследование антигенной структуры OmpF порина из *Y. pseudotuberculosis* (YpOmpF) с помощью синтетических пептидов, соответствующих петельным эпитопам порина, и мутантных белков с делециями наружных петель показало, что наружные петли, очевидно, не являются доминантными Т-эпитопами в антигенной структуре порина псевдотуберкулезного микроба. Преимущественное количество Т-эпитопов формируется из коротких фрагментов консервативных участков β-барреля YOmpF порина. Роль петель в формировании В-эпитопов YpOmpF более существенна, однако на некоторых участках аминокислотной последовательности белка (например, в области петель L4 и L5 и прилегающих к ним фрагментов β-барреля) формируются антигенные детерминанты линейного типа, что не характерно для В-эпитопов большинства мультидоменных белков [4, 13, 36].

Как многофункциональные белки, порины могут выполнять функции поверхностных адгезинов. Методом оптической ловушки оценено участие OmpF и OmpC поринов

*Y. pseudotuberculosis* в адгезии микроба к макрофагам J774. Показано, что порин OmpF, экспрессируемый при 8 °С, участвует в адгезии бактерий *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам, тогда как порин OmpC, синтезируемый при температуре 37 °С, указанным свойством не обладает. Эти результаты могут объясняться термоиндуцибельными различиями в первичной структуре и конформационных особенностях наружных петель молекул пориновых белков. Высказано предположение о значимости названных различий для эффективной циркуляции в природе и проявления инвазивных свойств *Y. pseudotuberculosis* как возбудителя сапрозоонозной инфекции [3].

Совместно с Лабораторией морской биохимии ведутся работы по изучению рекомбинантных аналогов белков НМ бактерий. Было показано, что водорастворимая форма рекомбинантного YpOmpF белка (rs-OmpF) имеет упорядоченную пространственную организацию на уровне вторичной и третичной структур белка. Полученный белок показал высокую эффективность в качестве диагностического антигена в ИФА при диагностике псевдотуберкулеза [25].

Проблема самосборки полипептидной цепи в высокоорганизованную функциональную структуру находится в центре внимания исследователей с 60-х годов прошлого века, когда было постулировано, что нативная структура белка определяется уникальной аминокислотной последовательностью и естественной окружающей средой. Понимание механизмов сворачивания белка и сопутствующей этому процессу агрегации имеет огромное значение не только для предсказания пространственной структуры белка по его аминокислотной последовательности, но и для решения многих прикладных задач, таких как получение рекомбинантных белков, создание искусственных белков с заданными свойствами, а также разработка препаратов для лечения заболеваний, связанных с нарушением фолдинга белка (болезни Альцгеймера, Паркинсона, прионные, кистозный фиброз и др.). Большинство исследований в части сворачивания белков выполнено на небольших однодоменных водорастворимых белках. Особенностью наших исследований является изучение путей сворачивания более сложных мультидоменных и мембранных белков. Исследовано поведение полностью развернутого rOmpF в водных средах. Показано, что при переводе из 8 М мочевины в воду, фосфатно-солевой буфер или буфер (рН 8,0), содержащий 0,8 М мочевины, развернутый порин образовывал относительно компактные мономерные интермедиаты, склонные к самоассоциации с образованием мультимеров. Олигомерные интермедиаты сворачивания имели высокое содержание вторичной структуры, близкой по типу к нативной, а также достаточно выраженную третичную структуру. Образование мультимеров, по-видимому, способствует не только сохранению структуры частично свернутых молекул белка, но и дальнейшей их структуризации. Одновременно с ассоциацией частично свернутых интермедиатов в исследованных растворах наблюдается образование очень крупных агрегатов, которому способствует присутствие соли и, особенно, кислый рН 5,0, близкий к изоэлектрической точке порина. Исследование показывает, что на размер и пространственную структуру мономерных интермедиатов и их ассоциатов, а также скорость протекания процессов самоорганизации порина большое влияние оказывает состав среды [18].

В некоторых случаях перенесенные иерсиниозные инфекции провоцируют развитие аутоиммунных процессов, в том числе патологии щитовидной железы (ЩЖ). Это связано с тем, что антитела к бактериальным антигенам, подобно аутоантителам, могут взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток ЩЖ и вызывать усиленный синтез тиреоидных гормонов (в том числе тироксина). На модели *in vivo* продемонстрирована способность антител к OmpC и OmpF поринам *Y. pseudotuberculosis* инициировать повышение уровня тироксина в крови мышей линии BALB/c [14]. В ходе дальнейшего исследования показано, что YOmpC и рецептор тиреотропного гормона человека (рТТГ) являются перекрестно-реагирующими антигенами. Поскольку эти белки имеют очень низкую гомологию первичной структуры, было высказано предположение, что формирование перекрестно реагирующих антигенных детерминант связано, скорее всего, с особенностями

конформации белковых молекул. Это предположение подтверждено с помощью компьютерного моделирования взаимодействия антигенных эпитопов YOmpF со стимулирующим антителом к рТТГ человека методом молекулярного докинга. Таким образом, аутоиммунное заболевание щитовидной железы (болезнь Грейвса), которое часто возникает как осложнение после перенесенного псевдотуберкулеза, может быть следствием наличия гомологичных конформационных антигенных детерминант у YOmpF и рТТГ [34].

Изучение механизмов адаптации бактерий к стрессовым условиям важно для понимания основ вирулентности и патогенности бактерий, а также для разработки эффективных способов борьбы с инфекциями. Нами показано, что бактерии *Y. pseudotuberculosis* обладают способностью регулировать соотношение анионного фосфатидилглицерина и нейтрального фосфатидилэтаноламина и, следовательно, величину отрицательного заряда НМ при тепловом стрессе. Предполагается, что это может быть общей стратегией, используемой патогенными бактериями для обеспечения барьерной функции в условиях стресса. Отмечены принципиальные различия в термоиндуцированных изменениях фосфолипидного и жирнокислотного составов цитоплазматической и наружной мембран психротрофной бактерии *Y. pseudotuberculosis* в сравнении с мезофильной *E. coli*, которые, вероятно, объясняются различиями в содержании ферментов, участвующих в биосинтезе фосфолипидов и жирных кислот в этих видах бактерий [23].

Фосфолипаза A<sub>1</sub> (PldA—detergent-resistant phospholipase A<sub>1</sub>, ген *pldA*) является уникальным интегральным мембранным ферментом, найденным в грамотрицательных бактериях. Она погружена в фосфолипидный субстрат, что предполагает существование очень тонких механизмов регуляции ее ферментативной активности. Именно с активностью этого фермента связывают усиление вирулентных свойств бактерий. Нами впервые получена и охарактеризована рекомбинантная фосфолипаза A<sub>1</sub> из НМ психротрофной бактерии *Y. pseudotuberculosis* и установлена ее защитная функция в ответ на стрессовое воздействие фенола на клетку бактерий. Полноатомные модели высокой точности 3D-структуры мономера и димера фосфолипазы A<sub>1</sub> *Y. pseudotuberculosis* позволили установить функционально важные остатки фермента и выявить структурные различия с фосфолипазой A<sub>1</sub> *E. coli*. Показано, что фосфолипаза A1 *Y. pseudotuberculosis* в силу своей локализации на поверхности клетки не только является одним из факторов вирулентности грамотрицательных бактерий, но и относится к иммуногенным для человека и животных компонентам наружной мембраны этих бактерий [2].

Ключевую роль в приобретении *in vivo* белками нативной конформации, которая обеспечивает выполнение их биологических функций в клетке, играют специальные белки, названные молекулярными шаперонами. Шапероны помогают сворачиванию и препятствуют агрегации развернутого белка, сопровождают вновь синтезированный белок к месту его локализации в клетке, поддерживая в развернутом, активном для транслокации состоянии, предотвращают летальную неспецифическую ассоциацию белков в стрессовых для клетки условиях. В лаборатории впервые было показано, что белок Skp, ранее выделенный нами из *Y. pseudotuberculosis* и охарактеризованный, функционирует как периплазматический шаперон, для которого белками-субстратами являются белки наружной мембраны. В этом качестве он ингибирует агрегацию в водном окружении полностью развернутых молекул порина OmpF и фосфолипазы PldA, образуя с ним растворимые комплексы [19].

Skp *Y. pseudotuberculosis* обладает свойством неиммунным способом (минуя антигенсвязывающие участки иммуноглобулинов (антител)) связывать IgG человека и кролика как в виде мономера Skp [15], так и в форме гомотримера (Skp3) [17]. В ходе изучения иммуноглобулинсвязывающей активности rSkp нами получены результаты, которые показывают, что rSkp имеет сайты связывания на Fab- и Fc-фрагментах молекулы иммуноглобулина и что в образовании комплексов rSkp-IgG основную роль играют электростатические взаимодействия. Полученные результаты демонстрируют рН-зависимый характер активности rSkp. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы (RH до 10 нм) между

шапероном и IgG человека, а также его фрагментами образуются при кислых значениях pH среды. В случае защелачивания реакционной среды активность rSkp снижается, и агрегация белков-субстратов хотя и замедляется, но в меньшей степени, чем при кислом pH. Данные, полученные при изучении кинетики связывания и аффинности взаимодействия rSkp с IgG, вносят важный вклад в установление механизма pH-зависимой шаперонной активности Skp *Y. pseudotuberculosis* [16]. Полученная информация может представлять интерес для разработчиков стабильных, качественных биофармацевтических препаратов на основе иммуноглобулинов.

В настоящее время все более актуальной становится проблема получения мембранных белков с применением методов биотехнологии. Решение ее позволит получать индивидуальные белки в количествах, необходимых как для научных исследований, так и для использования по медицинскому назначению (в качестве диагностических, вакцинных, терапевтических препаратов, средств их доставки и др.). Проводимые в лаборатории исследования связаны с разработкой подходов к экспрессии в *E. coli* мембранных белков в виде нерастворимых агрегатов в цитоплазме клетки, так называемых телец включения (ТВ), с высоким содержанием корректно свернутого целевого белка. В качестве модельных белков используются интегральные белки НМ *Y. pseudotuberculosis* порин OmpF и фосфолипаза A<sub>1</sub>. Проведено изучение влияния условий культивирования клеток-продуцентов (концентрации индуктора, времени и температуры) на уровень экспрессии рекомбинантного белка и его структурные характеристики в составе ТВ. Как показано, из всех изученных факторов наибольшее влияние на конформацию рекомбинантного белка оказывает температура. Полученные при пониженной температуре ТВ содержат больше корректно свернутого белка и растворяются в более мягких условиях, что позволяет значительно увеличить выход функционально активных рекомбинантных белков. Новая информация, полученная в ходе выполнения этой работы, вносит вклад в понимание структурной организации и механизма образования ТВ, в развитие новых подходов для получения функционально активных белков из ТВ, а также ТВ, обладающих биологической и функциональной активностью [1].

С момента основания института одной из основных тематик исследований наших сотрудников было изучение структуры и свойств полисахаридов водорослей. До настоящего момента это направление остается одним из важнейших в лаборатории. Главными объектами этих исследований в последние десятилетия являются красные водоросли, широко распространенные в дальневосточных морях и являющиеся источником сульфатированных полисахаридов – каррагинанов, полимерная цепь которых построена из повторяющихся дисахаридных звеньев, состоящих из остатков D-галактозы и ее производных, соединенных регулярно чередующимися  $\beta$ -(1→4) и  $\alpha$ -(1→3) гликозидными связями. Химическая структура этих галактанов характеризуется большим разнообразием и так называемой замаскированной регулярностью. Она может быть представлена комбинацией различных идеальных звеньев, распределенных вдоль полимерной цепи, и замаскирована хаотичным расположением моносахаридных остатков. Подобные полисахариды представляют собой так называемые молекулярные гибриды. Структурное разнообразие каррагинанов обусловлено видовой принадлежностью водорослей, их физиологией (фазами жизненного роста) и условиями обитания макрофитов. Ранее нами были выделены и установлены структуры каррагинанов из водорослей семейств Gigartinales и Tichocarpales и показана их зависимость не только от видовой принадлежности водорослей, но и от фазы жизненного цикла. В последние годы наше внимание привлекли широко представленные на российском Тихоокеанском побережье водоросли семейства Phyllophorales. Полисахаридный состав этого семейства слабо изучен. Согласно немногочисленным литературным данным, некоторые представители Phyllophorales, произрастающие в южных морях, являются источником необычных по структуре и физико-химическим характеристикам сульфатированных галактанов, которые содержат и агар, и каррагинан. В большинстве случаев трудно установить, имеет полисахарид гибридную структуру или

представляет собой смесь различных компонентов, каждый из которых проявляет регулярность, типичную для классического каррагинана или агара. Структурное разнообразие сульфатированных полисахаридов красных водорослей может быть обусловлено и присоединением к главной полимерной цепи моносахаридных остатков – производных галактозы или ксилозы.

Детальный анализ полисахарида из водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, одного из представителей этого семейства, показал зависимость структурных особенностей полисахаридов от фазы жизненного цикла водоросли. Согласно полученным данным, желирующий полисахарид из стерильной формы водоросли представляет собой каррагинан с гибридной каппа/бета структурой, основными звеньями которой являются каппа-каррабиоза, каппа-карратетраоза, каппа-каррагексаоза, бета-каррабиоза, бета-карратетраоза, тетра- и гекса-олигосахариды с различными последовательностями чередования каппа- и бета-звеньев, а минорные количества йота- и гамма-каррагинана распределены хаотично вдоль полимерной цепи. Желирующий полисахарид из репродуктивной формы *A. flabelliformis* имеет структуру йота/каппа-каррагинана, построенную из йота-карратетраозы, йота-каррабиозы, а также гибридных блоков, содержащих галактозу (G) и ангидрогалактозу (DA): тетра- (DA2S-G4S-DA-G4S, DA-G4S-DA2S-G4S) и гексасахаридов (DA2S-G4S-DA2S-G4S-DA-G4S, DA-G4S-DA2S-G4S-DA2S-G4S, DA2S-G4S-DA-G4S-DA2S-G4S), с различной последовательностью йота- и каппа-звеньев и содержит минорные количества ню-каррагинана. Установлено, что ксилоза является заместителем одной из гидроксильных групп β-D-галактозы, предположительно в шестом положении [30].

Сравнительный анализ полисахаридов (ПС), выделенных из водоросли *A. flabelliformis*, собранной при разных условиях обитания, показал, что наибольший выход ПС наблюдается в период сбора водоросли, характеризующегося низкими значениями температуры воды и освещенности (среднесуточной дозы фотосинтетически активной радиации (ФАР)). ПС представляют собой сульфатированные галактаны гибридной структуры, содержащие дисахаридные звенья каппа- и йота-каррагинанов. ПС с более регулярной структурой продуцируют водоросли, собранные при низкой температуре, а галактаны высокой степени сульфатирования синтезируют водоросли, растущие при большей освещенности. Установлено, что наиболее благоприятным временем сбора водоросли *A. flabelliformis*, позволяющим получить полисахариды с высоким выходом, является период с низкой температурой воды и освещенностью [29].

Среди представителей семейства Phyllophoraceae найден новый источник каррагинана – красная водоросль *Mastocarpus pacificus*. Структурный анализ выделенного полисахарида позволяет отнести его к каррагинану, полимерная цепь которого построена в основном из каппа- и йота-каррабиозных звеньев.

С привлечением методов кислотного и ферментативного гидролиза подтверждена гибридная структура ранее выделенного желирующего полисахарида из водоросли *Tichocarpus crinitus*. Установлено, что его полимерная цепь состоит из блоков регулярного каппа (-G4S-DA-), протяженных блоков бета (G-DA-), а также гибридных блоков каппа/бета-каррагинана (-G4S-DA-G-DA-) с включением звеньев йота- (-G4S-DA2S-) и гамма-каррагинана (-G-D6S-) [28].

В последние годы появились многочисленные данные о разносторонней биологической активности сульфатированных полисахаридов красных водорослей, что заставило обратить на них внимание как на возможные объекты для создания новых средств медицинского назначения. Каррагинаны относятся к растворимым пищевым волокнам и внесены в список пищевых и медицинских компонентов при строгом соответствии определенным параметрам, регламентированным Объединенным экспертным комитетом Всемирной организации здравоохранения по пищевым добавкам (JECFA). Несмотря на признание каррагинана безопасным, следует отметить, что биологическая активность данных полисахаридов изучена в основном на стандартных образцах, выпускаемых фирмой «Sigma», и результаты этих исследований не дают полной картины физиологического



эффекта природных каррагинанов, имеющих более сложные структуры. Выполненное нами исследование с привлечением серии экспериментов *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* показало, что каррагинаны не проявляют токсичности по отношению к жизнеспособности различных клеток. Методами химической деполимеризации с последующим фракционированием продуктов деградации, а также ферментативного гидролиза получены низкомолекулярные производные каррагинанов из водорослей *Chondrus armatus*, *Tichocarpus crinitus* и *A. flabelliformis*. Сравнительный анализ биологической активности различных типов каррагинанов и их олигосахаридов показал, что низкомолекулярные производные каррагинанов сохраняют способность индуцировать синтез цитокинов иммунокомпетентными клетками, но в меньшей степени, чем исходные полисахариды. При этом полисахариды и их низкомолекулярные производные оказывают разное действие на процесс воспаления толстой кишки у мышей на модели экспериментального химически индуцированного колита. Выявлена зависимость противовоспалительной активности каррагинанов от их молекулярной массы и концентрации и установлено, что исходный каррагинан, в отличие от его олигосахаридов, проявляет выраженную противовоспалительную активность [27]. Таким образом, иммуномодулирующие свойства полисахаридов могут обеспечивать их потенциальное применение для стимулирования иммунного ответа или контроля активности иммунных клеток, в частности смягчения таких негативных эффектов, как воспаление.

Широкий набор образцов каррагинанов, различающихся моносахаридным составом, степенью сульфатирования, местоположением сульфатных групп и их распределением вдоль полимерной цепи, позволяет проводить в лаборатории работы по изучению взаимосвязи структуры и функции полимеров. Нами изучено влияние каррагинанов различных структурных типов (каппа-, лямбда-, каппа/бета-) на жизнеспособность эпителиальных клеток кишечника человека HT-29 и показано, что все исследуемые каррагинаны инертны по отношению к HT-29 эпителиальным клеткам кишечника в нормальных условиях, но обладают превентивным эффектом, восстанавливая жизнеспособность клеток, нарушенную обработкой этанолом. Низкое содержание сульфатов и наличие 3,6-ангидрогалактозы в каппа/бета-каррагинане является необходимым условием для восстанавливающей способности каррагинана по отношению к клеткам эпителия кишечника человека HT-29 [38].

В экспериментах *in vitro* рассмотрен эндотоксин-нейтрализующий эффект каррагинанов различных структурных типов из водорослей семейств Gigartinales и Tichocarpaceae. Показано, что каррагинаны подавляют агрегацию тромбоцитов и ингибируют синтез активных форм кислорода, индуцированные ЛПС. Каррагинаны с низкой степенью сульфатирования активируют ЛПС-индуцированный синтез противовоспалительного цитокина – интерлейкина-10 иммунокомпетентными клетками крови человека и конкурируют с ЛПС за связывание с TLR4-рецепторами [37, 47].

Каппа/бета-каррагинан из водоросли *T. crinitus*, показавший наивысшую активность в тестах *in vitro*, был выбран для изучения защитного действия полисахаридов *in vivo* при экспериментальной ЛПС-индуцированной эндотоксемии. Внутрижелудочное введение каррагинана на фоне эндотоксемии вызывает увеличение уровня IL-10 в 2,5 раза и снижает продукцию ФНО- $\alpha$  в 2 раза по сравнению с контролем. Показано, что каррагинан уменьшает чрезмерную активацию воспалительных клеток, вызванную ЛПС [26]. Совокупность проведенных исследований позволяет предположить, что эндотоксин-нейтрализующий эффект каррагинана, вероятно, осуществляется через иммуномодулирующие свойства каррагинанов и его влияние на макромолекулярную структуру эндотоксина. Протективный эффект каррагинана может быть обусловлен его влиянием на макромолекулярную структуру ЛПС, о чем свидетельствуют данные, полученные методами электронной микроскопии, динамического светорассеяния и электрокинетических измерений [47].

Одним из широко используемых в промышленности и медицине полисахаридов является хитозан. В основе антибактериальных свойств полимера лежит его способность связываться с компонентами наружной мембраны бактерий. Нами показано, что хитозан [24]

и его ацилированные производные [31] образуют стабильные комплексы с анионными ЛПС и снижают их токсичность [39], позволяя считать этот поликатион перспективным в деле создания препаратов для борьбы с патологическими проявлениями грамотрицательных инфекций. Хитозан при нанесении на природные минералы (цеолит и глину) сохраняет свою способность связывать ЛПС [21]. С использованием ЛАЛ-теста показано, что полученные композиты позволяют удалять эндотоксин из водных растворов [7], что создает предпосылки для разработки на их основе сорбентов для очистки водных субстанций медицинского назначения.

Хитозан и его низкомолекулярное производное обладают противовоспалительным эффектом, предотвращая химически индуцированное воспаление толстой кишки у экспериментальных животных, снижая степень и площадь повреждения. Совокупность литературных и полученных в нашем эксперименте данных позволяет говорить об определяющей роли структуры хитозана в проявлении его противовоспалительных свойств, в то время как величина молекулярной массы полисахарида не является важным параметром в этом случае [9].

В последнее десятилетие для доставки лекарственных препаратов широко используются липосомы. Проводимое в лаборатории изучение возможности использования липосом как контейнера для введения полисахаридов (каррагинанов и хитозанов) и включение в их состав векторных молекул может значительно увеличить эффективность биологического действия этих биополимеров. В лаборатории разработан метод получения липосом, содержащих каппа-каррагинан из водоросли *C. armatus*, и показано, что при pH раствора 5,0 и 7,0 в нейтральные и катионные липосомы включается около 12 % полисахарида [6]. Использование ацилированных производных хитозана в составе липосомальных форм позволяет усилить антиэндотоксические свойства этого полисахарида при пероральном и внутривентральном введении, снизив токсическое влияние ЛПС на организм мыши и достоверно увеличив выживаемость (83–100 %) животных в эксперименте в результате защиты липосом от агрессивного воздействия среды ЖКТ. Антиэндотоксическое действие хитозанов, вероятно, связано с их способностью подавлять синтез провоспалительных цитокинов в иммунокомпетентных клетках [11].

Выраженная биологическая активность каррагинанов в сочетании с их гелеобразующими свойствами позволяет рассматривать эти полисахариды в качестве основы для создания новых лекарственных форм. В последние годы резко увеличилась доля систем доставки лекарственных препаратов через слизистую оболочку, что связано в основном с простотой и удобством использования трансмукозных препаратов, которые не требуют особой стерильности и могут применяться в виде спреев, гелей, пленок, липосом через пероральный/буккальный и трансбуккальный пути введения. Мукоадгезивность таких систем обычно достигается путем создания гидрофильных трансмукозных матриц на основе полимеров, обладающих способностью связываться со слизистой оболочкой различных тканей или мукозой (от лат. *mucus*) в течение значительного времени. Каррагинаны, благодаря простому механизму термообратимого гелеобразования, вязкоупругим свойствам, а также биосовместимости, доступности и широкому спектру их биологической активности, являются идеальным полимером для приготовления различных форм трансмукозных систем доставки лекарственных препаратов.

Нами изучена возможность использования различных типов каррагинанов в качестве матриц для включения эхинохрома (ЭХ) – лекарственной субстанции препарата Гистохром®, разработанного в ТИБОХ. Результаты показали, что каррагинан улучшает растворимость ЭХ и предотвращает его окислительную деградацию. Методами ИК-спектроскопии, сканирующей микроскопии и электрокинетических измерений показано, что ЭХ взаимодействует с каррагинаном, встраивается в его макромолекулярную структуру, образует растворимый комплекс. Скорость высвобождения ЭХ из полисахаридной матрицы зависит от структуры каррагинана и присутствия специфических для полисахарида ионов. Комплекс ЭХ/каррагинан обладает мукоадгезивными свойствами и

проявляет гастропротекторную активность, превышающую активность эталонного препарата Фосфолюгель [46].

Для создания устойчивой неинвазивной лекарственной формы на основе ЭХ получены липосомы, содержащие каррагинан и растворенный в нем ЭХ. Установлено, что загрузка липосом каррагинаном приводит к изменению их  $\zeta$ -потенциала до отрицательных значений, что вместе с увеличением размеров липосом позволяет предположить образование на их поверхности полисахаридной оболочки. ЭХ при инкапсулировании в липосомы не окисляется и сохраняет стабильность в процессе лиофилизации. Эффективность включения ЭХ в липосомы составляет 48 %. При добавлении липосом, нагруженных ЭХ, к муцину из желудка свиньи наблюдается изменение  $\zeta$ -потенциала, размера и морфологии частиц, что свидетельствует о взаимодействии липосом с муцином. Согласно данным ИК-спектроскопии при контакте липосом со слизистой тканью кишечника 50 % ЭХ после высвобождения связывается с этой тканью, что указывает на мукоадгезивные свойства липосомной формы каррагинана с включенным ЭХ [48].

Для получения различных композиционных материалов особый интерес представляют полиионные полисахариды морского происхождения в силу их доступности, биоразлагаемости и биосовместимости. Наличие в лаборатории большого ряда каррагинанов различных структурных типов, с одной стороны, и хитозанов различной степени ацетилирования и полимеризации, с другой – позволило получить широкий набор полиэлектролитных комплексов (ПЭК) хитозан/каррагинан в растворимой форме, в виде пленочных и гелевых композитов [8, 41].

Методом компьютерного моделирования *in silico* впервые рассчитаны теоретические модели 3D структуры комплексов и показано, что хитозан может иметь несколько сайтов связывания с двойной спиралью каррагинана [42]. С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучена надмолекулярная структура комплексов и показана ее зависимость от соотношения исходных компонентов. Исследование серии комплексов хитозана с каппа-каррагинаном ( $\kappa$ -КН) с различным соотношением исходных компонентов показало, что комплексы  $\kappa$ -КН с избытком поликатиона представляют собой положительно заряженные частицы, стабилизированные свободными аминогруппами хитозана, расположенными на поверхности волокон  $\kappa$ -КН. При формировании отрицательно заряженных комплексов с преобладанием полианиона хитозан встраивается в сетчатую структуру  $\kappa$ -КН и вызывает ее разукрупнение. Комплексы с высоким содержанием  $\kappa$ -КН ингибируют формирование биопленок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [43].

Водорастворимый комплекс, созданный на основе  $\kappa$ -КН и хитозана, снижает выраженность воспалительной реакции, индуцированной гистамином, и проявляет ярко выраженную гастропротекторную активность [44]. Полученный ПЭК может найти применение в медицине для профилактики и лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также для снижения побочного ulcerогенного действия нестероидных противовоспалительных средств и других лекарственных препаратов.

Комплексы хитозана с каппа/бета-каррагинаном ( $\kappa / \beta$ -КН) в растворимой форме и в виде пленок проявляют мукоадгезивные свойства. Способность пленок к мукоадгезии зависит от типа полисахарида и изменяется при образовании комплекса. Сравнительный анализ значений  $\zeta$ -потенциала, определенных в водном растворе и в растворе, содержащем муцин, подтвердил наличие мукоадгезивных свойств и у растворимой формы ПЭК [8].

Таким образом, проводимые в лаборатории исследования сочетают в себе фундаментальные и прикладные составляющие. Разноплановые масштабные работы с привлечением широкого арсенала методов физико-химической биологии позволяют понять механизмы патогенности и вирулентности бактерий, механизмы иммуностимулирующего действия биополимеров и на этой основе разрабатывать новые подходы для эффективной борьбы с инфекциями. Накопленные теоретические знания позволяют нам создавать новые медицинские диагностикумы, изыскивать новые подходы к созданию вакцин,

разрабатывать рекомбинантные препараты, средства для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями, иммуностимулирующие препараты, гастропротекторные средства, различные композиты для доставки и пролонгирования действия активных субстанций.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бахолдина С.И., Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Быстрицкая Е.П., Пименова Е.А., Соловьева Т.Ф. Влияние условий экспрессии рекомбинантной фосфолипазы А1 из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* на структуру и свойства телец включения // Биоорг. химия. 2018. Т. 44, № 2. С. 163–174.
2. Бахолдина С.И., Тищенко Н.М., Сидорин Е.В., Исаева М.П., Лихацкая Г.Н., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Рекомбинантная фосфолипаза А1 из наружной мембраны психротрофной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*: экспрессия, очистка, характеристика // Биохимия. 2016. Т. 81, № 1. С. 122–134.
3. Бывалов А.А., Коньшев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Белозеров В.С., Хоменко В.А., Давыдова В.Н. Адгезивность поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 // Биофизика. 2018. Т. 63, № 5. С. 913–922.
4. Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинцев С.Г., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Оводов Ю.С. Исследование поверхностных антигенных эпитопов *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью моноклональных антител // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50, № 2. С. 203–210.
5. Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Гузев К.В., Вакорина Т.И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Структура и функция порообразующих белков бактерий рода *Yersinia*. 1. Выделение и сравнительная характеристика физико-химических свойств и функциональной активности поринов иерсиний // Биоорг. химия. 2006. Т. 32, № 4. С. 371–383.
6. Горбач В.И., Ермак И.Н. Липосомы как носители сульфатированных полисахаридов из морских водорослей для их доставки в организм // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017. Т. 70, № 3. С. 82–84.
7. Горбач В.И., Давыдова В.Н., Бондаренко Д.С., Шапкин Н.П., Ермак И.М. Связывание эндотоксинов грамотрицательных бактерий сорбентами, модифицированными хитозаном // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы XII междунар. науч. конф. Пермь, 2014. С. 121–125.
8. Давыдова В.Н., Володько А.В., Мищенко Н.П., Ермак И.М. Мукоадгезивные системы на основе хитозана как матрицы для включения активной субстанции эхинохром // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54, № 5. С. 477–482.
9. Давыдова В.Н., Калитник А.А., Марков П.А., Володько А.В., Попов С.В., Ермак И.М. Цитокин-индуцирующая и противовоспалительная активность хитозана и его низкомолекулярного производного // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52, № 5. С. 460–466.
10. Лихацкая Г.Н., Чистюлин Д.К., Ким Н.Ю., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. Сравнительный анализ пространственной структуры неспецифических поринов *Yersinia ruckeri* методами оптической спектроскопии и молекулярного моделирования // Биофизика. 2016. Т. 61, вып. 6. С. 1088–1097.
11. Набережных Г.А., Бахолдина С.И., Володько А.В., Давыдова В.Н. Протективный эффект липосом, покрытых хитозаном и его ацилированным производным, при моделировании эндотоксмии у мышей // Мед. иммунология. 2015. Т. 17. С. 35.
12. Новикова О.Д., Хоменко В.А., Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Сидорова О.В., Чистюлин Д.К., Соловьева Т.Ф. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий. Структура и свойства // Вестн. ДВО РАН. 2014. № 1. С. 120–134.
13. Портнягина О.Ю., Сидорова О.В., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Иммунохимическая характеристика синтетических пептидов, включающих T- и B-клеточные эпитопы неспецифических поринов патогенных иерсиний // Биоорг. химия. 2010. Т. 36, № 6. С. 779–788.
14. Портнягина О.Ю., Голотин В.А., Зелепуга Е.А., Хоменко В.А., Шевченко Л.С., Новикова О.Д. Неспецифические порины *Yersinia pseudotuberculosis* как индукторы экспериментального гипертиреоза у мышей // Биол. эксперимент. биол. мед. 2018. Т. 166, № 12. С. 714–717.
15. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифионов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G // Биохимия. 2009. Т. 74, № 4. С. 501–514.
16. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Взаимодействие шаперона Skp из *Y. pseudotuberculosis* с мультидоменными белками при разных значениях pH среды // Актуальные вопр. биол. физики и химии. 2018. Т. 3, № 4. С. 869–873.
17. Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* // Биохимия. 2012. Т. 77, № 11. С. 1571–1583.
18. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Дмитренко П.С., Стенкова А.М., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Самоорганизация рекомбинантного мембранного порина OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* в водных средах // Биохимия. 2017. Т. 82, № 11. С. 1657–1669.

19. Сидорин Е.В., Сидорова О.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Дмитренко П.С., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Шаперонная активность иммуноглобулин-связывающего белка *Yersinia pseudotuberculosis* // Биол. мембраны. 2015. Т. 32, № 3. С. 217–220.
20. Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Романенко Л.А., Портнягина О.Ю., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. Белковый состав клеточной оболочки бактерии *Shewanella frigidimarina* P1 2–35 (Gammaproteobacteria: Shewanellaceae) // Биология моря. 2016. Т. 42, № 1. С. 48–54.
21. Шапкин Н.П., Ермак И.М., Разов В.И., Давыдова В.Н., Хальченко И.Г., Шкураев А.Л. Получение органомодифицированных алумосиликатов для очистки биологических растворов // Журн. неорг. химии. Т. 59, № 6. С. 766–770.
22. Bystritskaya E., Stenkova A., Chistyulin D., Chernysheva N., Khomenko V., Anastyuk S., Isaeva M. Adaptive responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability // Microbiol. Open. 2016. Vol. 5, N 4. P. 597–603.
23. Davydova L., Bakholdina S., Barkina M., Velansky P., Bogdanov M., Sanina N. Effects of elevated growth temperature and heat shock on the lipid composition of the inner and outer membranes of *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochimie. 2016. Vol. 123. P. 103–109.
24. Davydova V., Volod'ko A., Sokolova E., Chusovitin E., Balagan S., Gorbach V., Galkin N., Yermak I., Solov'eva T. The supramolecular structure of LPS-chitosan complexes of varied composition in relation to their biological activity // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 123. P. 115–121.
25. Golotin V., Portnyagina O., Chopenko N., Kim N., Rasskazov V., Novikova O. Production of recombinant porin from *Y. pseudotuberculosis* in a water-soluble form for pseudotuberculosis diagnostics // Biol. Chem. 2017. Vol. 398, N 11. P. 1229–1236.
26. Kalitnik A., Karetin Y., Kravchenko A., Khasina E., Yermak I. Influence of carrageenan on cytokine production and cellular activity of mouse peritoneal macrophages and its effect on experimental endotoxemia // J. Biom. Mater. Res. Pt A. 2017. Vol. 105, N 5. P. 1549–1557.
27. Kalitnik A., Anastyuk S., Barabanova A., Glazunov V., Yermak I., Marcov P., Popov S., Ovodov Y. Gelling polysaccharide from *Chondrus armatus* and its oligosaccharides: The structural peculiarities and anti-inflammatory activity // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 115. P. 768–775.
28. Kalitnik A., Anastyuk S., Sokolova E., Kravchenko A., Khasina E., Yermak I. Oligosaccharides of  $\kappa/\beta$ -carrageenan from the red alga *Tichocarpus crinitus* and their ability to induce interleukin 10 // J. Appl. Phycol. 2016. Vol. 28, N 1. P. 545–553.
29. Kravchenko A., Byankina (Barabanova) A., Glazunov V., Yakovleva I., Yermak I. Seasonal variations in a polysaccharide composition of Far Eastern red seaweed *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Phylloporaceae) // J. Appl. Phycol. 2018. Vol. 30, N 1. P. 535–545.
30. Kravchenko A., Anastyuk S., Isakov V., Sokolova E., Glazunov V., Yermak I. Structural peculiarities of polysaccharide from sterile form of Far Eastern red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 111. P. 1–9.
31. Naberezhnykh G., Gorbach V., Kalmykova E., Solov'eva T. Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor // Biophys. Chem. 2015. Vol. 198. P. 9–13.
32. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 67, N 4. P. 593–656.
33. Novikova O., Chistyulin D., Khomenko V., Sidorin E., Kim N., Sanina N., Solov'eva T., Shnyrov V. Peculiarities of thermal denaturation of OmpF porin from *Yersinia ruckeri* // Mol. Biosyst. 2017. Vol. 13, N 9. P. 1854–1862.
34. Portnyagina O., Zelepuga E., Khomenko V., Solov'eva E., Solov'eva T., Novikova O. In silico and in vitro analysis of cross-reactivity between *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF porin and thyroid-stimulating hormone receptor // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 107. P. 2484–2491.
35. Rokitskaya T., Kotova E., Naberezhnykh G., Khomenko V., Gorbach V., Firsov A., Solov'eva T., Novikova O. Single channel activity of OmpF-like porin from *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes. 2016. Vol. 858, N 4. P. 883–891.
36. Sidorova O., Khomenko V., Portnyagina O., Likhatskaya G., Vakorina T., Kim N., Solov'eva T., Novikova O. Mutant OmpF porins of *Yersinia pseudotuberculosis* with deletions of external loops: Structure-functional and immunochemical properties // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. Vol. 445, N 2. P. 428–432.
37. Sokolova E., Karetin Y., Davydova V., Byankina A., Kalitnik A., Bogdanovich L., Yermak I. Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS *in vitro* // J. Biomed. Mater. Res. Pt A. 2016. Vol. 104, N 7. P. 1603–1609.
38. Sokolova E., Kuz'mich A., Byankina A., Yermak I. Effect of carrageenans alone and in combination with casein or lipopolysaccharide on human epithelial intestinal HT-29 cells // J. Biomed. Mater. Res. Pt A. 2017. Vol. 105, N 10. P. 2843–2850.
39. Solov'eva T., Davydova V., Krasikova I., Yermak I. Marine compounds with therapeutic potential in gram-negative sepsis // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11, N 6. P. 2216–2229.
40. Solov'eva T., Likhatskaya G., Khomenko V., Guzev K., Kim N., Bystritskaya E., Isaeva M. The impact of length variations in the L2 loop on the structure and thermal stability of non-specific porins: The case of OmpCs

- from the *Yersinia pseudotuberculosis* complex // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*. 2018. Vol. 1860, N 2. P. 515–525.
41. Volod'ko A., Davydova V., Barabanova A., Solov'eva T., Ermak I. Formation of soluble chitosan-carrageenan polyelectrolyte complexes // *Chem. Nat. Compound*. 2012. Vol. 48, N 3. P. 353–357.
  42. Volod'ko A., Davydova V., Glazunov V., Likhatskaya G., Yermak I. Influence of structural features of carrageenan on the formation of polyelectrolyte complexes with chitosan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. Vol. 84. P. 434–441.
  43. Volod'ko A., Davydova V., Nedashkovskaya O., Terentjeva N., Chusovitin E., Galkin N., Yermak I. Morphology, electrokinetic characteristics and the effect on biofilm formation of carrageenan:chitosan polyelectrolyte complexes // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 117. P. 1118–1124.
  44. Volod'ko A., Davydova V., Chusovitin E., Sorokina I., Dolgikh M., Tolstikova T., Yermak I. Soluble chitosan-carrageenan polyelectrolyte complexes and their gastroprotective activity // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 101. P. 1087–1093.
  45. Wang F., Wang J., Jian H., Zhang B., Li S., Wang F., Xiao X. Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3 // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, N 4. e1937.
  46. Yermak I., Mischchenko N., Davydova V., Glazunov V., Tarbeeva D., Kravchenko A., Sorokina I. Carrageenansulfated polysaccharides from red seaweeds as matrices for the inclusion of echinochrome // *Mar. Drugs*. 2017. Vol. 15, N 11. P. 337.
  47. Yermak I., Sokolova E., Davydova V., Solov'eva T., Aminin D., Reunov A., Lapshina L. Influence of red algal polysaccharides on biological activities and supramolecular structure of bacterial lipopolysaccharide // *J. Appl. Phycol.* 2016. Vol. 28, N 1. P. 619–627.
  48. Yermak I., Gorbach V., Glazunov V., Kravchenko A., Mischchenko N., Pimenova E., Davydova V. Liposomal form of the echinochrome-carrageenan complex // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 9. P. 324.