

Научный журнал

Учредители

ФГБУ Дальневосточное отделение РАН

ФГБУНО Центральная научная

библиотека ДВО РАН

Журнал основан в 1932 г.

Издание прекращено в 1939 г.,

возобновлено в 1990 г.

ВЕСТНИК

ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ОТДЕЛЕНИЯ

РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ
НАУК

5 (207). 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Академик РАН Георгий Борисович Еляков (1929–2005 гг.). <i>Н.М. ШЕПЕТОВА</i>	5
В.А. СТОНИК. 55 лет Тихоокеанскому институту биоорганической химии им. Г.Б. Елякова	11
П.С. ДМИТРЕНОК. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН: современное состояние и перспективы развития	30

Биоорганическая химия

Н.В. ИВАНЧИНА, А.А. КИЧА, Т.В. МАЛЯРЕНКО, А.И. КАЛИНОВСКИЙ, П.С. ДМИТРЕНОК, В.А. СТОНИК. Исследования полярных стероидов морских звезд: структуры, биологические активности, биологическая роль, биосинтез	35
В.И. КАЛИНИН, С.А. АВИЛОВ, А.С. СИЛЬЧЕНКО. Исследование структуры тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН	40
Т.Н. МАКАРЬЕВА, А.Г. ГУЗИЙ, Л.К. ШУБИНА, Е.Г. ЛЯХОВА, С.А. КОЛЕСНИКОВА, К.М. ТАБАКМАХЕР, Е.К. КУДРЯШОВА, В.А. СТОНИК. Поиск и структурное изучение новых биоактивных вторичных метаболитов из морских беспозвоночных	48
Ш.Ш. АФИЯТУЛЛОВ, О.И. ЖУРАВЛЕВА. Совместное культивирование морских грибов-микромитозов – перспективный способ получения новых биоактивных вторичных метаболитов	57
Н.И. КУЛЕШ, С.А. ФЕДОРОВ, М.В. ВЕСЕЛОВА, В.А. ДЕНИСЕНКО, В.П. ГРИГОРЧУК. Водорастворимые изофлавоноиды из корней <i>Maackia amurensis</i>	66
Е.В. ЛЕЩЕНКО, Е.В. ИВАНЕЦ, М.П. СОБОЛЕВСКАЯ. Вторичные метаболиты грибов-микромитозов морских растений	71
Р.В. УСОЛЬЦЕВА, Т.Н. ЗВЯГИНЦЕВА, С.П. ЕРМАКОВА. Структурное разнообразие ламинаранов бурых водорослей, перспективы их использования	84

Молекулярная фармакология

Д.Л. АМИНИН, И.Г. АГАФОНОВА, Г.Н. ЛИХАЦКАЯ, Е.Л. ЧАЙКИНА, М.М. АНИСИМОВ. Лаборатория биоиспытаний ТИБОХ ДВО РАН: история и перспективы исследований биологически активных соединений	90
--	----

Молекулярная иммунология

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	101
И.В. ЧИКАЛОВЕЦ, В.И. МОЛЧАНОВА, Т.О. МИЗГИНА, А.П. ФИЛЬШТЕЙН, П.А. ЛУКЬЯНОВ, О.В. ЧЕРНИКОВ. Углеводсвязывающие белки и полисахариды морских гидробионтов	115

Молекулярная биология и генетика

Л.А. БАЛАБАНОВА, М.П. ИСАЕВА. Морская биохимия: достижения и перспективы структурно-функционального исследования генов и геномов морских организмов	123
М.М. МОНАСТЫРНАЯ, Е.В. ЛЕЙЧЕНКО, И.Н. ГЛАДКИХ, Е.А. ЗЕЛЕПУГА, О.В. СИНЦОВА, Р.С. КАЛИНА, А.Н. КВЕТКИНА, Э.П. КОЗЛОВСКАЯ. Фармакологический потенциал пептидов актиний рода <i>Heteractis</i>	128

Р.С. КАЛИНА, Е.В. ЛЕЙЧЕНКО, М.М. МОНАСТЫРНАЯ, Э.П. КОЗЛОВСКАЯ. Нейротоксины актиний как инструмент воздействия на работу нервной системы	134
Морская микробиология	
В.В. МИХАЙЛОВ. Исследования Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН в области морской микробиологии	139
Органическая химия	
В.Л. НОВИКОВ, Н.Н. БАЛАНЕВА, О.П. ШЕСТАК, В.П. ГЛАЗУНОВ. Возможные направления реакций 2-гидроксинафтазариннов разного структурного типа с триэфирами ортокарбоновых кислот	143
Установки и экспедиции	
Е.А. ЮРЧЕНКО, А.Н. ЮРЧЕНКО, Д.Л. АМИНИН. Морские экспедиции ТИБОХ ДВО РАН в Южно-Китайское море (2004–2018 гг.)	149
М.И. КУСАЙКИН. Морские природные соединения как активные компоненты эффективных лекарств, БАД, функциональных продуктов питания и косметических средств	153
Ученые Дальнего Востока	
Академик РАН П.Г. Горовой – исследователь растений. <i>Е.В. НОВОЖИЛОВА</i>	157

Главный редактор вице-президент РАН академик РАН В.И. СЕРГИЕНКО

Заместитель главного редактора В.С. ЖЕРДЕВ

Ответственный секретарь Л.А. РУСОВА

Редакционная коллегия:

- акад. РАН А.В. АДРИАНОВ – научный руководитель (президент) Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН В.А. АКУЛИЧЕВ – научный руководитель Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН П.Я. БАКЛАНОВ – научный руководитель Тихоокеанского института географии ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН В.В. БОГАТОВ (зам. главного редактора) – главный ученый секретарь ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН С.Ю. БРАТСКАЯ – зав. лабораторией Института химии ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН Б.А. ВОРОНОВ – научный руководитель Института водных и экологических проблем ДВО РАН, Хабаровск
- акад. РАН М.А. ГУЗЕВ – директор Института прикладной математики ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН Г.И. ДОЛГИХ – зам. директора по научным вопросам Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН Ю.Н. ЖУРАВЛЁВ – главный научный сотрудник Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН А.Г. КЛЫКОВ – зав. отделом Федерального научного центра агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск
- акад. РАН Ю.Н. КУЛЬЧИН – научный руководитель Института автоматизации и процессов управления ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН В.Л. ЛАРИН (зам. главного редактора) – научный руководитель Института истории, археологии и этнографии народов Дальнего Востока ДВО РАН, Владивосток
- чл.-корр. РАН Б.В. ЛЕВИН – научный руководитель Института морской геологии и геофизики ДВО РАН, Южно-Сахалинск
- д.г.-м.н. Ю.А. МАРТЫНОВ – зав. лабораторией Дальневосточного геологического института ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН П.А. МИНАКИР – научный руководитель Института экономических исследований ДВО РАН, Хабаровск
- д.ф.-м.н. С.В. ПРАНЦ – зав. отделом Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН В.А. СТОНИК – научный руководитель Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
- акад. РАН А.И. ХАНЧУК – научный руководитель Дальневосточного геологического института ДВО РАН, Владивосток

Scientific journal

Founders

Far Eastern Branch of RAS

Central Scientific Library, FEB RAS

The journal was found in 1932

The publication was discontinued in 1939,
was resumed in 1990

VESTNIK

OF THE FAR EAST BRANCH

OF THE RUSSIAN
ACADEMY
OF SCIENCES

5 (207). 2019

CONTENTS

Georgiy Borisovich Elyakov (1929–2005), member of the Russian Academy of Science. <i>N.M. SHEPETOVA</i>	5
V.A. STONIK. 55 years of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry	11
P.S. DMITRENOK. G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences – current status and prospects for development	30
Bioorganic chemistry	
N.V. IVANCHINA, A.A. KICHA, T.V. MALYARENKO, A.I. KALINOVSKIY, P.S. DMITRENOK, V.A. STONIK. Studies of starfish polar steroids: structures, biological activities, probable biological function, biosynthesis	35
V.I. KALININ, S.A. AVILOV, A.S. SIL'CHENKO. Structural studies on sea cucumber triterpene glycosides in G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the FEB RAS	40
T.N. MAKARIEVA, A.G. GUZII, L.K. SHUBINA, E.G. LYAKHOVA, S.A. KOLESNIKOVA, K.M. TABAKMAKHER, E.K. KUDRYASHOVA, V.A. STONIK. Search and structural study of new bioactive secondary metabolites from marine invertebrates	48
Sh.Sh. AFYATULLOV, O.I. ZHURAVLEVA. Co-cultivation of marine micromycetes fungi is a promising way of obtaining new bioactive secondary metabolites	57
N.I. KULESH, S.A. FEDOREEV, M.V. VESELOVA, V.A. DENISENKO, V.P. GRIGORCHUK. Water soluble isoflavonoids from <i>Maackia amurensis</i> roots	66
E.V. LESHCHENKO, E.V. IVANETS, M.P. SOBOLEVSKAYA. Secondary metabolites of micromycetes fungi of marine plants	71
R.V. USOLTSEVA, T.N. ZVYAGINTSEVA, S.P. ERMAKOVA. The structural diversity of laminarans of brown algae. Prospects for use of laminarans	84
Molecular pharmacology	
D.L. AMININ, I.G. AGAFONOVA, G.N. LIKHATSKAYA, E.L. CHAYKINA, M.M. ANISIMOV. Laboratory of bioassays of the PIBOC FEB RAS: history and prospects of research on biologically active compounds	90
Molecular immunology	
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'EVA. 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	101
I.V. CHIKALOVETS, V.I. MOLCHANOVA, T.O. MIZGINA, A.P. FILSHTEIN, P.A. LUKYANOV, O.V. CHERNIKOV. Carbohydrate-binding proteins and polysaccharides of marine hydrobionts	115
Molecular biology and genetics	
L.A. BALABANOVA, M.P. ISAEVA. Marine biochemistry: achievements and prospects of structural and functional researches of genes and genomes of marine organisms	123
M.M. MONASTYRNAYA, E.V. LEYCHENKO, I.N. GLADKIKH, E.A. ZELEPUGA, O.V. SINTSOVA, R.S. KALINA, A.N. KVETKINA, E.P. KOZLOVSKAYA. Pharmacological perspectives of peptides from sea anemones of the <i>Heteractis</i> genus	128

R.S. KALINA, E.V. LEYCHENKO, M.M. MONASTYRNAYA, E.P. KOZLOVSKAYA. Neurotoxins from sea anemones as an instrument for intervention into the nervous system activity	134
Marine microbiology	
V.V. MIKHAILOV. Researches of PIBOC FEB RAS in the area of marine microbiology	139
Organic chemistry	
V.L. NOVIKOV, N.N. BALANEVA, O.P. SHESTAK, V.P. GLAZUNOV. Possible directions of the reactions of different structural type 2-hydroxynaphthazarins with triesters of orthocarboxylic acids	143
Equipment and expeditions	
E.A. YURCHENKO, A.N. YURCHENKO, D.L. AMININ. Marine expeditions of PIBOC FEB RAS in the South China Sea (2004–2018)	149
M.I. KUSAYKIN. Marine natural compounds as active components of effective medicines, dietary supplements, functional foods and cosmetics	153
Scientists of the Far East	
P.G. Gorovoy, member of Russian Academy of Sciences – plant resercher. <i>E.V. NOVOZHILOVA</i>	157

Chief Editor V. I. SERGIENKO, Academician, Vice-President of RAS

Deputy Chief Editor V.S. ZHERDEV

Executive Secretary L.A. RUSOVA

Editorial staff:

- A.V. ADRIANOV, Academician of RAS – Research Supervisor (President), A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok
- V. A. AKULICHEV, Academician of RAS – Research Supervisor, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS, Vladivostok
- P.Ya. BAKLANOV, Academician of RAS – Research Supervisor, Pacific Geographical Institute, FEB RAS, Vladivostok
- V.V. BOGATOV, Corresponding Member of RAS (Deputy Chief Editor) – Chief Scientific Secretary, FEB RAS, Vladivostok
- S.Yu. BRATSKAYA, Corresponding Member of RAS – Chief of Laboratory, Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok
- G.I. DOLGIKH, Academician of RAS – Deputy Director for Research, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS, Vladivostok
- M.A. GUZEV, Academician of RAS – Director, Institute of Applied Mathematics, FEB RAS, Vladivostok
- A.I. KHANCHUK, Academician of RAS – Research Supervisor, Far East Geological Institute, FEB RAS, Vladivostok
- A.G. KLYKOV, Corresponding Member of RAS – Head of the Department, Federal Scientific Center of Agrobiotechnology in the Far East named after A.K. Chaika, Ussuriysk
- Yu.N. KULCHIN, Academician of RAS – Research Supervisor, Institute of Automation and Control Processes, FEB RAS, Vladivostok
- V.L. LARIN, Corresponding Member of RAS (Deputy Chief Editor) – Research Supervisor, Institute of History, Archaeology and Ethnography of the Peoples of the Far East, FEB RAS, Vladivostok
- B.V. LEVIN, Corresponding Member of RAS – Research Supervisor, Institute of Marine Geology and Geophysics, FEB RAS, Yuzhno-Sakhalinsk
- Yu.A. MARTYNOV, Doctor of Geological-Mineralogical Sciences – Chief of Laboratory, Far East Geological Institute, FEB RAS, Vladivostok
- P.A. MINAKIR, Academician of RAS – Research Supervisor, Economic Research Institute, FEB RAS, Khabarovsk
- S.V. PRANTS, Doctor of Physical-Mathematical Sciences – Head of the Department, V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, FEB RAS, Vladivostok
- V.A. STONIK, Academician of RAS – Research Supervisor, G.B. Elyakov Pacific Institute of Biorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok
- B.A. VORONOV, Corresponding Member of RAS – Research Supervisor, Institute of Water and Ecological Problems, FEB RAS, Khabarovsk
- Yu.N. ZHURAVLEV, Academician of RAS – Chief Researcher, Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok

Академик РАН Георгий Борисович Еляков (1929–2005 гг.)

13 сентября 2019 г. исполнилось бы 90 лет академику РАН Георгию Борисовичу Елякову, директору-основателю Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (1964–2001 гг.), вице-президенту РАН и председателю ДВО РАН (1990–2001 гг.).

Г.Б. Еляков принадлежал к тому довольно редкому типу людей, кто не боится нового. Новая лаборатория, новый институт, новое научно-исследовательское судно, новое производство. Георгий Борисович первым из своего ближайшего окружения освоил компьютер и увлеченно следил за всеми новинками в этой области. С юности он в совершенстве владел немецким благодаря своему другу Ласло Берешу, с которым жил в одной комнате общежития МГУ. Однако когда для общения с иностранными коллегами ему понадобился английский, Георгий Борисович за очень короткий срок выучил новый для него язык, проявив редкостное упорство и целеустремленность. Когда в 1959 г. академик М.А. Лаврентьев (в то время председатель Сибирского отделения АН СССР) предложил молодому кандидату химических наук, уже имевшему хорошую работу в Москве, создать лабораторию в Дальневосточном филиале СО АН СССР, он согласился.

Уже в 1963 г. на общем собрании Сибирского отделения Георгий Борисович сделал доклад по итогам и перспективам работы своего небольшого коллектива, и все присутствующие тут же проголосовали за преобразование лаборатории в институт. Сам Еляков вспоминал: «Мы твердо решили, что в институте ни в коем случае не должно быть «провинциальной науки». То есть мы себе не позволим никаких скидок на отдаленность от крупных научных центров или, скажем, на экзотичность наших объектов. Каждое исследование будет выполняться на самом современном уровне». Год спустя на базе его лаборатории и был создан Институт биологически активных веществ (ИнБАВ), впоследствии переименованный в Тихоокеанский институт биоорганической химии (ТИБОХ), который хорошо известен не только в нашей стране и носит имя своего создателя. Георгий Борисович оставался бессменным директором института до 2001 г., вплоть до перехода его в ранг советника РАН. Широта взглядов, глубокая эрудиция и талант организатора позволили ему определить главные научные направления института, до сих пор не утратившие своей актуальности: химия природных соединений из дальневосточных лекарственных растений, морская биоорганическая химия и биотехнология, молекулярная иммунология, энзимология и морская микробиология.

С именем академика Елякова связано становление и интенсивное развитие фундаментальных научных исследований на Дальнем Востоке. Георгий Борисович создал научную школу по изучению природных соединений, официально признанное название которой «Выделение и синтез физиологически активных соединений из морских микроорганизмов и других биологических источников» отражает основные интересы его научной деятельности. Под руководством Г.Б. Елякова установлено строение нескольких сотен ранее неизвестных веществ, относящихся к разным классам химических соединений, осуществлен синтез наиболее перспективных из них, разработаны биопрепараты для пищевой промышленности и сельского хозяйства, а также препараты, ставшие полноценными



Аспирант МГУ, 1953 г. Таких Г.Б. Елякова, наверное, никто не помнит. Здесь и далее фото из архивов ТИБОХ ДВО РАН и семьи Еляковых



Несмотря на занятость, Георгий Борисович не оставлял своего увлечения охотой. Начало 1960-х годов



Академик Б.А. Неуньлов (крайний слева), Г.Б. Еляков (в центре), президент Академии наук СССР академик М.В. Келдыш (второй справа), первый секретарь Приморского крайкома КПСС В.П. Ломакин (крайний справа), 1970 г.

Член-корреспондент РАН
Г.Б. Еляков – директор
ИнБАН Дальневосточного
филиала СО АН СССР, 1970 г.



Г.Б. Еляков (крайний справа) и капитан НИС «Профессор Богоров» Г.Т. Ноздрин (крайний слева) во время захода на Мальдивские острова, 1983 г.



Председатель Совета директоров Дальневосточного морского пароходства В.М. Миськов (крайний справа) поздравляет академика РАН Г.Б. Елякова (крайний слева) с 70-летним юбилеем



75-летний юбилей академика РАН Г.Б. Елякова, 2004 г. Слева направо: члены-корреспонденты РАН С.Н. Кочетков и В.Е. Васьковский, профессор С.М. Деев, академики РАН Г.Б. Еляков и П.Я. Бакланов

лекарствами. В 1993 г. в рамках программы развития на Дальнем Востоке новой отрасли промышленности – производства биохимических реактивов и препаратов на базе комплексной переработки морского биологического сырья – началось строительство опытно-экспериментального завода ТИБОХ. По замыслу Георгия Борисовича, этот завод должен был стать связующим звеном между наукой и производством. Его строительство завершило цикл: сбор морского сырья, выделение и исследование биологически активных веществ, выпуск опытных партий биопрепаратов и лекарственных форм на их основе.



Георгий Борисович с сестрой Галиной и дочерью Татьяной. Москва, 1998 г.

Много сил и внимания Г.Б. Еляков уделял воспитанию научной смены. В прошлом аспирант Ю.К. Юрьева, который в свою очередь был учеником самого Н.Д. Зелинского – одного из основоположников органического катализа и нефтехимии, Георгий Борисович понимал важность педагогической деятельности. Ею он начал заниматься сразу по приезду во Владивосток, став доцентом кафедры химии Дальневосточного технического института рыбной промышленности и хозяйства. В 1975 г. Еляков создал и возглавил кафедру биоорганической химии при химическом факультете Дальневосточного государственного университета, в 1996 г. преобразованную в отделение биоорганической химии и биотехнологии. Георгий Борисович обладал глубокими знаниями своего предмета, у него были золотые руки химика-экспериментатора. Остается только сожалеть,



Георгий Борисович с удовольствием занимался восстановлением своего дома под Костромой, 1998 г.

что из-за административных обязанностей, требовавших полной отдачи, Георгию Борисовичу пришлось оставить работу «у стола» практически сразу после защиты докторской диссертации. Однако у него всегда хватало сил и времени на просмотр многочисленных научных материалов. Он принимал активное участие в подготовке статей и монографий, увлеченно готовил свои доклады для международных симпозиумов и конференций.

Благодаря дальновидности Георгия Борисовича, понимавшего, что для эффективных исследований институту необходима надежная сырьевая база, в 1966 г. на берегу живописной бухты Троицы в Хасанском районе появилась Морская экспериментальная станция (МЭС). МЭС на долгие годы стала не только полигоном для сбора биологических объектов, но и местом встреч ученых со всей страны и из-за рубежа. Почти каждый год здесь проводили научные школы и конференции.

Одним из любимых своих «творений» Георгий Борисович считал НИС «Академик Опарин». Немало усилий было затрачено им, сначала чтобы доказать необходимость такого судна для морских биохимических исследований, затем чтобы найти деньги на его строительство. Он принимал участие в разработке проекта, подборе и установке необходимого оборудования, а потом работал в семи экспедициях в качестве начальника или научного консультанта. В 2004 г. после долгого перерыва на НИС «Академик Опарин» была организована экспедиция в территориальные воды Вьетнама. Георгию Борисовичу очень хотелось принять в ней участие, но этот, как он сам сказал, «мой последний рейс» для него так и не состоялся.

Георгий Борисович казался жестким человеком. Близко знавшие его люди между собой в шутку даже называли его бандитом за то, что, идя к намеченной цели, он умел добиться

своего, преодолевая любые преграды. Кто-то боялся его, но даже у несогласных он вызывал уважение. Ему можно было возражать, потому что как человек сильный он не любил приспособленцев. Услышав иную точку зрения, Георгий Борисович долго и внимательно смотрел на смельчака поверх очков, будто решая «казнить или помиловать», и главное в этот момент – не испугаться и не отступить. Побеждала разумность и порядочность Георгия Борисовича, его забота о деле, а не примитивное «начальник всегда прав», что встречается довольно часто.

Георгий Борисович умел мгновенно уловить суть проблемы, правильно расставить приоритеты и никогда не изменял своим главным принципам. Несмотря на любовь к родному институту, как председатель Дальневосточного отделения он мог отказать коллегам в просьбе, например, о дополнительном финансировании: «Вы у меня не одни, таких институтов у меня 35». Когда в 90-х годах наступили тяжелые для академических институтов времена, Еляков смело выступил против разрушения науки, был готов вместе со своими коллегами академиками В.А. Коптюгом и Г.А. Месяцем обратиться за поддержкой к мировой научной общественности. Он даже принял участие в митинге ученых ДВО РАН, когда сотрудники институтов в знак протеста перекрыли главную магистраль Владивостока.

Любимое дело всегда занимало в жизни Георгия Борисовича главное место, и ради этого дела он мог поступиться многим, даже здоровьем. Был случай, когда уже в солидном возрасте он, едва приземлившись в Анкоридже, куда прибыл для участия в международной конференции, без колебания улетел обратно. Причиной столь поспешного возвращения стало приглашение тогдашнего губернатора Приморского края Евгения Ивановича Наздратенко принять участие в очень важном совещании у председателя Совета министров Виктора Степановича Черномырдина. Пока Георгий Борисович летел обратно, совещание отменили, но, вернувшись, он не стал сетовать: «Я человек государственный. Мне сказали надо быть – и я вернулся. Было бы гораздо хуже, если бы совещание состоялось, и на нем решались бы вопросы, важные для Приморского края и Дальневосточного отделения, а меня бы там не было».

В течение 37 лет академик Еляков возглавлял ТИБОХ, более 10 лет был председателем ДВО РАН и вице-президентом РАН. Он родился в Костроме, но всегда чувствовал себя дальневосточником, а годы, прожитые во Владивостоке, считал лучшими в своей жизни. Даже став жителем Москвы, он большую часть времени по-прежнему проводил в любимом городе. В городе, где остался созданный им институт и развивалось задуманное им производство новых лекарственных препаратов, откуда уходило в океан построенное им судно. В городе, который назвал академика Елякова своим Почетным гражданином.

Г.Б. Еляков награжден орденами Трудового Красного Знамени (дважды), «Знак почета», «За заслуги перед Отечеством» 3-й степени и медалями. Цикл его работ «Новые природные соединения из иглокожих и губок. Структура, особенности биосинтеза и свойства» отмечен премией им. М.М. Шемякина (1995 г.). Поистине достойные итоги жизни достойного человека.

*ШЕПЕТОВА Наталья Михайловна,
помощник директора по международным связям
(Тихоокеанский институт биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток).
E-mail: piboc@bk.ru*

В.А. СТОНИК

55 лет Тихоокеанскому институту биоорганической химии им. Г.Б. Елякова

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ) за 55 лет своего существования стал одним из ведущих академических институтов на Дальнем Востоке России. В настоящем сообщении приводятся краткие сведения о некоторых достижениях коллектива института, примечательных датах его истории и замечательных ученых, работавших и продолжающих здесь работать. Обсуждены главные научные направления института, наиболее значимые научные результаты и роль института в мировых исследованиях природных биологически активных соединений.

Ключевые слова: ТИБОХ, история, научные достижения, научные направления.

55 years of the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry. V.A. STONIK (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

Over 55 years of its existence, the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (PIBOC) has become one of the leading research institutes located in the Far-Eastern region of Russian Federation. Some of the achievements of the Institute's team, remarkable dates in its biography and outstanding scientists who worked and continued to work within its walls – brief information on all this is given in this report. The main scientific directions of the Institute, the most significant of the obtained scientific results, and the role of the Institute in world studies of natural biologically active compounds are discussed.

Key words: PIBOC, history, scientific results, scientific directions.

Краткая история Института [1, 3, 8, 14]

Институт биологически активных веществ в составе Дальневосточного филиала Сибирского отделения Академии наук СССР (ДВФ СО АН СССР) был создан по распоряжению Совета министров РСФСР от 3 октября 1963 г. № 4297-р. 6 марта 1964 г. президент АН СССР акад. М.В. Келдыш подписал постановление президиума АН СССР № 79 «Об организации Института биологически активных веществ (ИнБАВ) ДВФ СО СССР» на базе лабораторий природных биологически активных соединений и фармакологии ДВФ СО АН СССР. Директором-организатором института был назначен к.х.н. Георгий Борисович Еляков (приказ от 14 февраля 1964 г.).

В составе института было сформировано 6 лабораторий: лаборатория терпеноидов и стероидов (рук. Г.Б. Еляков); лаборатория фармакологии (рук. И.И. Брехман); лаборатория флоры и фауны моря (рук. В.Е. Васьковский); лаборатория биохимии (рук. Г.Д. Бердышев, с 1971 г. – В.А. Рассказов); лаборатория растительного сырья (рук. П.Г. Горовой), лаборатория углеводов (рук. Ю.С. Оводов). Были созданы также 3 исследовательские группы – химии гуминовых кислот (рук. О.Б. Максимов), органического микроанализа (рук. Л.И. Глебоко) и физико-химических методов исследования (рук. А.К. Дзизенко). Через год в институте появилась еще одна лаборатория – технологии, которую возглавил Н.И. Супрунов.

СТОНИК Валентин Аронович – доктор химических наук, академик РАН, научный руководитель института (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток).
E-mail: stonik@piboc.dvo.ru

В 1966 г. в Хасанском районе Приморского края была создана Морская экспериментальная станция (МЭС), которая распоряжением президиума СО АН СССР в 1967 г. была включена в состав института как его отдельное подразделение.

В 1967 г. директор института Г.Б. Еляков защитил докторскую диссертацию, посвященную изучению химического строения гликозидов легендарного лекарственного растения уссурийской тайги – женьшеня, а в 1970 г. был избран членом-корреспондентом АН СССР.

С 1970 г. сотрудники института стали принимать участие в комплексных морских экспедициях на НИС «Витязь», «Дмитрий Менделеев», «Изумруд» и др.

В 1971 г. была разработана рецептура и начато производство горькой настойки «Золотой Рог».

В 1972 г. распоряжением президиума АН СССР № 874 институт получил свое нынешнее название – Тихоокеанский институт биоорганической химии. Был создан специализированный Ученый совет по защите кандидатских диссертаций. Началось активное сотрудничество с Академией наук Республики Куба, и до конца 70-х годов сменяющие друг друга группы наших сотрудников работали сначала в Институте океанологии, а затем в Национальном институте онкологии и радиобиологии (Т.А. Кузнецова, А.П. Петров, С.В. Мороз, Г.М. Фролова и многие другие).

В 1974 г. в результате реорганизации структуры института в состав отдела низкомолекулярных биорегуляторов, который возглавил Г.Б. Еляков, вошли вновь созданные лаборатории: биосинтеза (руководитель Г.Б. Еляков, с 1977 г. – В.А. Стоник), органического синтеза (Н.И. Уварова), растительных гликозидов (Л.И. Стригина), химии гуминовых кислот (О.Б. Максимов).

В 1975 г. создан отдел молекулярной иммунологии (руководитель Ю.С. Оводов), куда были включены лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета (Т.Ф. Соловьева), неинфекционного иммунитета (А.Ф. Павленко) и химии углеводов (Ю.С. Оводов). В том же году были сформированы лаборатории химии ферментов (Л.А. Елякова), биоиспытаний и механизмов действия биологически активных веществ (М.М. Анисимов), а лаборатория биохимии преобразована в лабораторию морской биохимии (В.А. Рассказов). Начато производство «Уссурийского бальзама», рецептуру которого разработали сотрудники института.

В 1976 г. на НИС «Каллисто» проведена первая морская экспедиция, организованная ТИБОХ (начальник экспедиции В.А. Стоник). В конце того же года институт пережил разрушительный пожар, на несколько лет затормозивший его научную деятельность.

В 1978 г. в институте организованы группа химии белков и пептидов (позднее – лаборатория химии пептидов под руководством Э.П. Козловской) и лаборатория радиоизотопных методов анализа (А.М. Люцко). Лаборатория технологии была переименована в лабораторию биотехнологии (Ю.А. Панков).

В 1979 г. ТИБОХ переехал в новое, специально построенное для него здание.

В 1981 г. Г.Б. Еляков был избран заместителем председателя Дальневосточного отделения АН СССР.

В 1985 г. решением советского правительства для ТИБОХ ДВО РАН было построено научно-исследовательское судно «Академик Опарин», и начались регулярные экспедиции сотрудников института во многие морские акватории Мира.

В 1986 г. в ТИБОХ сформирована лаборатория морской микробиологии (руководитель В.В. Михайлов). В том же году на базе лаборатории биосинтеза были созданы две новые лаборатории – микробного биосинтеза (Т.А. Кузнецова) и химии морских природных соединений (В.А. Стоник), приступила к работе временная хозрасчетная научно-техническая лаборатория биодетоксикантов, перед которой была поставлена задача организации промышленного производства препарата «Зостерин», и запущено промышленное производство этого препарата (Г.П. Лямкин, Ю.Н. Лоенко). Под руководством В.В. Михайлова в институте началось создание коллекции морских микроорганизмов. На сельскохозяйственных предприятиях внедряется ветеринарный препарат «КД»,

одобренный к применению в качестве лечебного, профилактического и адаптогенного средства для пушных зверей, свиней и других животных (А.М. Ковалевская, В.М. Богуславский и др.).

В 1987 г. Георгий Борисович Еляков был избран академиком АН СССР, а в 1990 г. – председателем ДВО и вице-президентом АН СССР. В том же году д.х.н. Ю.С. Оводов был избран членом-корреспондентом АН СССР (с 1992 г. – академик РАН).

С 1991 г. специализированный Ученый совет института получил право принимать к защите докторские диссертации.

В 1991 г. П.Г. Горовой стал членом-корреспондентом РАН, а спустя четыре года – академиком РАН. В том же году членом-корреспондентом РАН был избран В.А. Стоник (с 2003 г. – академик РАН).

В 1993 г. академик Ю.С. Оводов, к.х.н. Р.П. Горшкова и д.х.н. Т.Ф. Соловьева получили премию им. И.И. Мечникова за работу в области молекулярной иммунологии. В 1995 г. за исследования в области биоорганической химии премией им. М.М. Шемякина были награждены академик Г.Б. Еляков, д.х.н. В.А. Стоник и к.х.н. Татьяна Николаевна Макарьева.

В 1998 г. д.х.н. Э.П. Козловская, к.х.н. В.А. Рассказов и А.А. Артюков получили грант администрации Приморского края на выполнение исследований по комплексной переработке отходов крабового промысла. Эта работа в конечном итоге привела к созданию медицинского препарата «Коллагеназа КК».

В 1999 г. приказом Минздрава России было разрешено производство лекарственных препаратов «Гистохром», разработанных к.х.н. О.Б. Максимовым, С.А. Федоревым, Н.П. Мищенко и др., а спустя два года началось его серийное производство.

В 2000 г. налажен промышленный выпуск разработанных в институте безалкогольных бальзамов серии «Гербармарин». Д.б.н. В.Е. Васьковский был избран членом-корреспондентом РАН.

В 2001 г. член-корреспондент РАН В.А. Стоник был назначен и.о. директора института, а затем в 2002 г. избран директором института.

В 2003 г. в ТИБОХ введен в действие капиллярный ДНК-секвенатор Applied Biosystems 3130, выполнено клонирование гена порина бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* (к.б.н. В.А. Рассказов, к.м.н. М.П. Исаева) и установлена его первичная структура. Началось широкое применение методов молекулярной биологии и молекулярной генетики в исследованиях института.

В 2004 г. в ТИБОХ введены в строй опытно-экспериментальная установка (руководитель д.х.н. В.Ф. Ануфриев) и томограф «Фармаскан» для исследований лабораторных животных с модельными заболеваниями.

В 2005 г. были возобновлены морские тропические экспедиции в территориальные воды Вьетнама.

В 2006 г. д.б.н. В.В. Михайлов избран членом-корреспондентом РАН. Были выполнены дополнительные клинические испытания медицинского препарата «Коллагеназа КК».

В 2007 г. выпущены первые промышленные партии медицинского препарата «Максар», введен в строй белковый секвенатор Procise 492 cLC.

С 2006 по 2008 г. при поддержке гранта Минобрнауки Российской Федерации опытное производство института было оснащено новым оборудованием, здесь созданы четыре производственных участка. В 2008 г. запатентованы первые биологически активные добавки серии «Фуколам».

В 2009 г. запатентован способ диагностики иерсиниозов и создан диагностический набор для выполнения анализа. Введен в строй масс-спектрометр «Ультрафлекс Ш». Началось широкое применение в институте тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (к.х.н. П.С. Дмитренко).

В 2010 г. запущены в работу ЯМР-спектрометр «Avance-700» (к.х.н. В.В. Исаков), немного позже – криогенная приставка к ЯМР-спектрометру «Avance-500» и капиллярный

секвенатор ABI 3130 XL. Это способствовало активным исследованиям минорных метаболитов морских и наземных организмов и геномным исследованиям морских микро- и макроорганизмов.

В 2011 г. при поддержке международного общества токсикологов во Владивостоке и совместно с Институтом биорганической химии (ИБХ) РАН проведен 9-й Тихоокеанский конгресс по токсинам животного, растительного и микробиального происхождения.

В 2012 г. на Морской экспериментальной станции состоялась 14-я Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, а во Вьетнаме (Нячанг) сотрудниками института был организован 1-й Международный симпозиум по морским ферментам и полисахаридам (д.б.н. М.И. Кусайкин и др.).

В 2013 г. при изучении фармакологического действия медицинского препарата «Кумазид» был освоен метод MALDI-имиджинга (к.х.н. П.С. Дмитренко, д.б.н. Д.Л. Аминин).

С 2014 г. введен в работу геномный секвенатор Junior/Roche (454), выполнены полногеномные исследования ряда морских микроорганизмов.

В 2016 г. запущен масс-спектрометр с жидкостным нанохроматографом Bruker Maxis Impact LC-QTOF. Начали активно развиваться исследования в области метаболомики (к.х.н. П.С. Дмитренко, Р.С. Попов).

В 2017 г. по результатам конкурса институтов Российской академии наук ТИБОХ был отнесен к институтам первой категории. Выполнен ремонт главного корпуса института. Получен грант Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на проведение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок по теме «Эхинохром: неинвазивные лекарственные формы».

В конце 2017 г. исполняющим обязанности директора Института был назначен к.б.н. (ныне д.б.н.) Д.Л. Аминин, а с мая следующего года – к.х.н. П.С. Дмитренко, недавно ставший его директором. Был проведен 3-й Международный симпозиум Life Science – Науки о жизни (предыдущие симпозиумы состоялись в 2008 и 2013 гг.). Был осуществлен пробный запуск геномного секвенатора Min 10N (Oxford Nanopore).

С 2006 по 2019 г. по результатам совместных исследований ТИБОХ и ряда университетов Республики Корея были проведены 9 корейско-российских и российско-корейских симпозиумов (организатор Н.М. Шепетова).

Основатели института и его лидеры

Любой научный институт – это не столько здания и научное оборудование, сколько люди, посвятившие свою жизнь самоотверженному служению науке. Именно они определяли и определяют уровень научных исследований, атмосферу в коллективе и достижения института.

С историей ТИБОХ неразрывно связаны судьбы многих замечательных и достойных людей. Их много, живых и уже ушедших от нас. Обо всех невозможно рассказать в одной журнальной статье, но считаю своим долгом напомнить, кто стоял у истоков института, был организатором его первых лабораторий, кто развивал научные направления, растил учеников и последователей.

Академик РАН Юрий Семенович Оводов (1937–2014 гг.) в 1959 г. после окончания химического факультета МГУ был направлен по распределению в Институт органической химии СО АН СССР (Новосибирск). В 1960–1963 гг. обучался в аспирантуре Института химии природных соединений (Москва) под руководством академика Н.К. Кочеткова. В ТИБОХ – с момента его основания: сначала возглавлял лабораторию химии углеводов, с 1967 по 1987 г. был заместителем директора института, с 1976 г. – руководителем отдела молекулярной иммунологии. Юрий Семенович создал научную школу, последователи которой работали и работают в лабораториях этого отдела. Среди учеников Оводова много докторов и кандидатов наук, занимающихся актуальными направлениями молекулярной

иммунологии и биоорганической химии. Одним из ярких представителей школы Ю.С. Оводова был д.х.н. А.Ф. Павленко (1944–1991 гг.), открывший онкопрецепитины – гликопротеины, способные связывать онкофетальные антигены. Доброжелательность Юрия Семеновича, преданность науке, постоянная поддержка им учеников и коллег и роль, которую он сыграл в создании и развитии нашего института, – все это невозможно переоценить. Под его руководством, а он был лидером по складу характера, были начаты первые в стране исследования бактериальных липополисахаридов, изучены антигены бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*, установлено строение пектина зостерина и организовано его производство, разработаны замечательные диагностикумы, применяемые в медицине, создан полисахаридный компонент косметических кремов – препарат «Митилан». В 1994 г. Ю.С. Оводов переехал в г. Сыктывкар, где возглавил отдел молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, а затем и сам институт. С 1999 г. был директором Учебно-научного центра «Физико-химическая биология» при Сыктывкарском государственном университете. Академик Ю.С. Оводов руководил Научным советом по химии и технологии растительного сырья при Президиуме РАН.

Член-корреспондент РАН Виктор Евгеньевич Васьковский (1935–2016 гг.) родился в г. Артем Приморского края. В 1959–1964 гг. после окончания Московского государственного университета работал в лаборатории химии углеводов Института химии природных соединений АН СССР (ныне – ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова). В 1964 г. был приглашен в ИнБАН, где возглавил лабораторию химии флоры и фауны моря. В 1971–1974 гг. Виктор Евгеньевич как главный ученый секретарь президиума Дальневосточного научного центра АН СССР принимал активное участие в создании многих институтов ДВО РАН. С 1995 г., вернувшись в ТИБОХ после работы в Институте морской биологии ДВО РАН, Васьковский долгие годы руководил отделом молекулярной иммунологии, занимал должность главного научного сотрудника.

Виктор Евгеньевич активно способствовал развитию исследований биологически активных веществ морских организмов на Дальнем Востоке России, в 1960–1970-е годы был одним из создателей Морской экспериментальной станции ТИБОХ.

В 1996 г. в Дальневосточном государственном университете на базе существующей с 1975 г. кафедры химии природных соединений было организовано отделение биоорганической химии и биотехнологии, просуществовавшее около 15 лет. Для отделения Васьковский разработал и утвердил в Учебно-методическом объединении при МГУ учебные планы. Вместе с к.х.н. В.В. Совой и другими сотрудниками отделения профессор Васьковский создал атмосферу сердечного и заботливого отношения к студентам, помогал отделению обеспечить процесс обучения современными компьютерными базами данных, поддерживал научные начинания студентов. Отделение подготовило более 150 квалифицированных специалистов, молодые ученые нашего института в большинстве своем являются его выпускниками, многие из них стали кандидатами и докторами наук.

С возвращением Виктора Евгеньевича в ТИБОХ были возрождены школы молодых ученых, которые одно время проводились на МЭС. Эти школы постепенно переросли уровень региональных мероприятий, превратились во всероссийские конференции по актуальным проблемам химии и биологии, в которых участвуют молодые ученые, студенты и аспиранты из регионов Дальнего Востока, Москвы, Красноярска, других городов России, а для чтения лекций приглашаются ведущие российские и зарубежные ученые. Последняя из школ-конференций, в которой принял участие Виктор Евгеньевич, имела 15-й порядковый номер. А следующая, шестнадцатая, была посвящена ему.

Один из основателей института, заведующий лабораторией фармакологии д.м.н., профессор Израиль Ицкович Брехман (1921–1994 гг.) был выпускником Военно-медицинской академии (Ленинград). Участвовал в Великой Отечественной войне, служил на Тихоокеанском флоте (подполковник медицинской службы). Еще студентом разработал препарат «Прозамин», который до сих пор применяется в медицине. После демобилизации работал

в ДВФ АН СССР, затем короткое время – в Биолого-почвенном институте. В ИнБАН лаборатория Брехмана была одной из базовых. В ней изучали биологическую активность женьшеня. В результате препараты женьшеня были введены в советскую фармакопею, а постановлением Советского правительства для выращивания этого растения в Приморском крае был создан совхоз «Женьшень». Израиль Ицкович со своими сотрудниками исследовал фармакологические свойства растений семейства Аралиевые и обнаружил, что элеутерококк колючий проявляет стимулирующее и тонизирующее действие. Препараты элеутерококка нашли применение в медицине, пищевой промышленности и косметике, а его корни во времена СССР экспортировали в 15 стран мира. Созданная в лаборатории Брехмана горькая настойка «Золотой Рог» была запатентована в 11 странах мира.

Первым заведующим лабораторией биохимии был известный биохимик, фармаколог и геронтолог, тогда еще кандидат, а позднее доктор биологических наук Геннадий Дмитриевич Бердышев (1930–2016 гг.). Одно время Бердышев был личным врачом вождя Северной Кореи Ким Ир Сена. Незаурядная личность и известный ученый, он в короткое время создал коллектив, который исследовал состав ДНК различных морских организмов. Образцы ДНК в жидком азоте увозили в лабораторию биоорганической химии академика А.Н. Белозерского, где совместно с известным ученым, ныне членом-корреспондентом РАН Б.Ф. Ванюшиным, проводились исследования изменений степени метилирования ДНК на разных этапах нереста горбуши. Так была открыта возрастная специфичность метилирования ДНК у животных. В лаборатории Бердышева успешно велись работы по изучению ферментов-нуклеаз из морских рыб и других морских организмов. Геннадий Дмитриевич недолго проработал во Владивостоке: специфический приморский климат не подходил ни ему, ни его детям. Зато он оставил здесь перспективную лабораторию, в которой работали выпускники Владивостокского медицинского института В.А. Рассказов, Г.К. Каратаев, Ю.М. Гафуров, В.В. Галкин, ставшие позже известными исследователями.

К.б.н. Валерий Александрович Рассказов (1940–2018 гг.) назначен заведующим лабораторией биохимии в 1971 г. Основное направление его работ было связано с изучением ферментов нуклеинового обмена – молекулярных инструментов для геномной инженерии, молекулярной биологии и медицинской диагностики. В 1974 г. Валерий Александрович стал заместителем директора, он курировал морские экспедиции и МЭС, а позже – проектирование и строительство НИС «Академик Опарин». В.А. Рассказов – автор и соавтор более 200 печатных работ, в том числе высокоцитируемых статей в «Genome Research», «Glycobiology» и других престижных научных журналах. Это был ученый, обладающий энциклопедическими знаниями в области биомедицины, биотехнологии и природных соединений. Лаборатория под его руководством стала центром молекулярно-генетических исследований на Дальнем Востоке России. В сфере его научных интересов были разработка методов ранней диагностики различных заболеваний, выявление ферментов с необычными свойствами, геномное секвенирование, создание химерных белков, биогеохимические процессы в Мировом океане и многие другие проблемы науки, связанные с живыми системами.

Он любил музыку и литературу, всегда следил за публикациями в журналах «Nature» и «Science» и о самых интересных из них рассказывал своим коллегам. Его человеческая доброта, забота о ближних, в том числе сотрудников института, полезные врачебные советы запомнились многим.

Академик РАН Петр Григорьевич Горовой работает в институте с первого дня его создания. Лаборатория растительного сырья (переименована позднее в лабораторию хемотаксономии растений), которую он возглавил в 1964 г., внесла значительный вклад в изучение лекарственных растений. Петр Григорьевич является одним из лучших в стране знатоков медицинских растений, организатором и участником многих экспедиций в регионы Дальнего Востока России и сопредельные страны, в том числе в Республику Корея и США. Автор более 600 научных статей и 12 монографий, он известен своими трудами по систематике и биологическим ресурсам ряда семейств высших растений, включая зонтичные,

сложноцветные, берёзовые и др. Одним из первых академик П.Г. Горовой проанализировал присутствие в высших растениях антиоксидантов. Результаты исследований Петра Григорьевича привели к разработке рецептуры «Уссурийского бальзама».

К.х.н. Олег Борисович Максимов (1911–2001 гг.) – человек нелегкой судьбы и один из самых талантливых химиков института. В первые годы после создания ИнБАН он был назначен руководителем группы, а затем заведующим лабораторией химии гуминовых кислот. Олег Борисович родился в Москве в семье военного инженера, с 1918 г. жил во Владивостоке с матерью и сестрой. В 1933 г. окончил химическое отделение Владивостокского индустриального техникума, а позже экстерном – Государственный дальневосточный университет, работал на Тихоокеанской научно-промышленной станции (позднее – ТИНРО) и по совместительству – в ДВФ АН СССР, изучал липиды морских и пресноводных рыб. В 1934 г. академик В.Л. Комаров, руководивший тогда Дальневосточным филиалом АН СССР, направил Максимова работать над кандидатской диссертацией в Москву, в лабораторию, созданную академиком А.Е. Чичибабыным. Вскоре по совокупности опубликованных работ Олегу Борисовичу была присвоена ученая степень кандидата химических наук. Однако в 1936 г., по возвращении из Москвы, по ложному доносу одного из сослуживцев он был обвинен в антисоветской деятельности, арестован, осужден, лишен ученой степени и сослан на Колыму. Здесь он провел долгие годы – сначала в лагерях, а затем на поселении. Вернулся во Владивосток в 1960 г., работал в химической лаборатории ДВФ АН СССР. Ученую степень кандидата наук ему не восстановили, так как довоенные списки кандидатов наук были утеряны при эвакуации ВАК во время войны. Максимов вынужден был защищать диссертацию повторно в середине 60-х годов, уже по результатам исследований гуминовых кислот. Олег Борисович вместе с его учениками являются авторами лекарственных препаратов «Гистохром» и «Максар».

Заведующим группой, позже лабораторией физико-химических методов исследования был тогда еще не имевший ученой степени, а позже ставший доктором химических наук Анатолий Кириллович Дзизенко (1940–1983 гг.). Пройдя стажировку в Институте химии природных соединений и Институте общей и неорганической химии АН СССР, он сумел организовать в институте работу первых ЯМР-, масс-, ИК- и УФ-спектрометров, из лучших выпускников физического факультета ДВГУ 1965–1970 гг. выпуска подготовил научные кадры для своей лаборатории (многие из них и сейчас работают в институте). Анатолий Кириллович одно время выполнял обязанности заместителя директора института, а позже – главного ученого секретаря ДВО РАН.

К.х.н. Люция Игнатьевна Глебо, талантливый химик-аналитик, создала группу, а затем лабораторию микроанализа, сыгравшую важную роль в исследованиях института. Без участия аналитиков не было бы возможным создание в институте медицинских и других препаратов. Люция Игнатьевна по праву считается одним из соавторов таких разработок института, как «Максар» и «Гистохром».

Все руководители подразделений первых лет существования института отличались особой харизмой: они были интеллигентными, хорошо образованными, требовательными, но доброжелательными людьми, сумевшими создать работоспособные коллективы. Почти у всех из них через много лет были десятки учеников и последователей, которым они не только передали знания и опыт, но и воспитали в них увлеченность своим делом и преданность науке.

Большое значение для института имела работа его ученых секретарей. Они обеспечивали подготовку научных отчетов, планов исследовательской деятельности и организовывали работу Ученого совета. Каждый из них выполнял огромный объем рутинной, но необходимой научно-организационной работы. Д.х.н. Нина Ивановна Уварова (1928–2008 гг.), работавшая в институте с момента его основания, исполняла обязанности ученого секретаря с 1964 по 1975 г. На этом посту ее сменила к.х.н. Галина Ивановна Прокопенко (1946–2007 гг.), которая блестяще выполняла эту трудную работу с 1975 по 2007 г. Позднее до 2018 г. ученым секретарем института была д.х.н. Инна Николаевна

Красикова. На ее долю выпали сложные годы, связанные с реформой Российской академии наук, она многое сделала для получения институтом первой категории. В настоящее время ученым секретарем института является к.б.н. Валерия Валериевна Куриленко.

Лаборатории института

Новые руководители лабораторий и ведущие ученые продолжают сегодня славные традиции ТИБОХ 70-х и 80-х годов. Д.х.н., профессор Тамара Федоровна Соловьёва, начинавшая свою научную деятельность еще в ИнБАН, создала первоклассную лабораторию молекулярных основ антибактериального иммунитета (ЛМОАБИ). В последнее время эту лабораторию возглавляет к.х.н. Виктория Николаевна Давыдова.

Д.х.н., профессор Павел Александрович Лукьянов, ученик академика Ю.С. Оводова и д.х.н. А.Ф. Павленко, заведовал лабораторией химии неинфекционного иммунитета (ЛХНИ), сегодня руководит отделом молекулярной иммунологии. Он инициировал изучение лектинов – биополимеров, специфически связывающихся с углеводами, включая гликоконъюгаты. По этой проблеме он активно сотрудничает с китайскими учеными. В последние годы лабораторией руководит его талантливый ученик к.б.н. Олег Викторович Черников.

Лабораторию органического синтеза природных соединений (ЛОСПС) после ухода академика Г.Б. Елякова возглавил д.х.н. Виктор Филиппович Ануфриев. Лаборатория известна своими трудами по синтезу хиноидных природных соединений, в том числе активной субстанции гистохромов – эхинохрома А.

Во главе лаборатории микробиологии (ныне – лаборатория морской микробиологии, ЛММ) с середины 80-х годов стоит член-корреспондент РАН Валерий Викторович Михайлов. Лаборатория собрала и поддерживает единственную в России коллекцию морских микроорганизмов.

Лабораторией химии микробных метаболитов (ЛХММ), созданной в середине 80-х годов к.х.н. Татьяной Алексеевной Кузнецовой, в настоящее время руководит к.х.н. Шамил Шеребзянович Афиятулло. Сотрудниками лаборатории открыты десятки новых биологически активных природных соединений из морских грибов и бактерий.

Лабораторию химии пептидов (ЛХП) организовала и возглавляет д.х.н. Эмма Павловна Козловская, долгое время работавшая заместителем директора института. Она является одним из разработчиков медицинского препарата «Коллагеназа КК» и безалкогольных бальзамов серии «Гербамарин», принимала активное участие в создании и выпуске ряда других биопрепаратов.

На смену В.А. Стонику в качестве руководителя лаборатории химии морских природных соединений (ЛХМПС) в 2018 г. пришла к.х.н. Наталья Владимировна Иванчина. Это одна из самых больших лабораторий института. Здесь трудятся 5 докторов наук, а многие сотрудники имеют ученую степень кандидата химических наук. Среди наиболее значимых разработок лаборатории – ветеринарный препарат «КД» и иммуностимулятор «Кумазид».

Лаборатория биоиспытаний и механизмов действия биологически активных веществ (ЛБМДБАВ) была создана великим тружеником, участником многих морских экспедиций, бывшим начальником МЭС Михаилом Михайловичем Анисимовым, в честь которого названа часть морской станции – Анисимовка. Сегодня лабораторию возглавляет д.б.н. Дмитрий Львович Аминин, немало сделавший для применения в биоиспытаниях новых методов, основанных на флуоресценции.

Лабораторией химии природных хиноидных соединений (ЛХПХС), бывшей лабораторией химии гуминовых кислот, основанной О.Б. Максимовым, после его ухода из жизни руководила к.х.н. Ольга Евгеньевна Кривошекова, в последние годы ее возглавляет д.х.н. Сергей Александрович Федорев, один из разработчиков самых известных медицинских препаратов института.

Лабораторией химии ферментов (ЛХФ), основанной д.х.н. Л.А. Еляковой, долгое время руководила д.х.н., профессор Татьяна Николаевна Звягинцева. В последние годы лабораторией заведует д.х.н. Светлана Павловна Ермакова. Это одна из ведущих лабораторий института, в которой когда-то работали к.х.н. Виктория Васильевна Сова, Валерий Владимирович Фаворов, Эмма Павловна Козловская и другие ветераны института, а сегодня трудятся талантливые молодые ученые, исследующие ферменты углеводного обмена и их субстраты – полисахариды бурых водорослей.

Во главе лаборатории морской биохимии (ЛМБ) после ухода из жизни В.А. Рассказова стоит к.м.н. Марина Петровна Исаева. Она специалист в области молекулярной генетики и секвенирования геномов морских организмов.

Недавно в институте была реорганизована лаборатория инструментальных методов исследования (ЛИМИ) и возглавляет ее директор института к.х.н. Павел Сергеевич Дмитриенко. Лаборатория укомплектована опытными специалистами, докторами и кандидатами наук, но, к сожалению, не имеет достаточного количества молодых специалистов и нуждается в обновлении оборудования.

Лабораторией хемотаксономии растений (ЛХР) руководит академик РАН Петр Григорьевич Горовой. Таксономические исследования дальневосточных высших растений, выполняемые в этой лаборатории, основаны не только на использовании различных вариантов хроматографии, но и на применении микроморфологических данных и анализе кариотипов растений. Лаборатория участвует в химических исследованиях ряда других институтов России, Республики Казахстан и некоторых других стран.

Недавно созданную лабораторию молекулярной фармакологии и биомедицины (ЛМФБ) возглавляет к.х.н. Елена Владимировна Лейченко. Здесь работают в основном молодые ученые.

Лабораторией биотехнологии (ЛБ) руководит д.б.н. Александр Алексеевич Артюков. В ее задачи входит разработка технологий производства новых препаратов института.

Контрольно-аналитическим отделом (КАД), одной из важных задач которого является аналитическое сопровождение разработки и выпуска биопрепаратов и лекарств, руководит к.х.н. Наталья Петровна Красовская.

В патентном отделе многие годы работает Наталья Ивановна Стадниченко (сегодня начальник отдела). Она является одним из лучших знатоков патентного дела в Приморском крае.

Морскую экспериментальную станцию института в разное время возглавляли д.б.н. Владимир Александрович Николаев, Вячеслав Васильевич Сова, Михаил Михайлович Анисимов и др. На протяжении многих последних лет обязанности начальника МЭС выполняет Виталий Владимирович Наумов, который помог станции пережить трудные постперестроечные времена и сегодня немало делает для ее дальнейшего развития.

Опытно-экспериментальная установка – важнейшее структурное подразделение института, сотрудники которого обеспечивают практическую реализацию прикладных исследований. Более 10 лет это подразделение возглавлял д.х.н. Виктор Филиппович Ануфриев, а сегодня им руководит д.б.н. Михаил Игоревич Кусайкин. Здесь успешно трудятся главный технолог Евгения Валериевна Лукьянова, к.х.н. Николай Михайлович Ребачук, Михаил Васильевич Денисенко и др.

Важную роль в деятельности института играет отдел научной информации, которым много лет заведовала Валентина Андреевна Бабко. Недавно на смену ей пришла к.б.н. Юлия Валерьевна Дубровская.

Научные достижения и роль ТИБОХ в развитии науки на Дальнем Востоке России и в мире

В рамках одной статьи трудно даже перечислить все достижения ТИБОХ, поэтому ограничусь лишь отдельными результатами фундаментальных исследований

института за прошедшие 55 лет, которые мне представляются наиболее важными. Критериями для отбора были цитирование соответствующих работ и практическое использование полученных научных данных, в том числе другими учеными и научными коллективами.

В области энзимологии к таким достижениям можно отнести изучение ферментов нуклеинового обмена (к.б.н. В.А. Рассказов, Н.И. Мензорова, Л.Л. Терентьев, Н.А. Терентьева и др.). В конце 80-х – начале 90-х годов открыт уникальный фермент Са, Mg-ДНКазы из гепатопанкреаса камчатского краба. Этот фермент был первой специфичной к двухцепочечной ДНК нуклеазой, не расщепляющей одноцепочечные ДНК. В руках ученых оказался полезный «молекулярный инструмент» для исследований в области молекулярной генетики, биотехнологии и генодиагностики [13], поскольку с помощью специально подобранных коротких олигонуклеотидов (олигонуклеотидных зондов) можно было выполнить разрыв в любом заранее заданном месте (сайте) ДНК. Дальнейшие работы велись в сотрудничестве с лабораторией академика РАН С.А. Лукьянова (ИБХ РАН, Москва). Было показано, что фермент может быть использован для анализа мононуклеотидных замен в ДНК пациентов, которые связаны с различными заболеваниями, а также для нормализации комплементарной ДНК [70, 71], обогащенной полноразмерными нуклеотидными последовательностями.

Обнаружение трансгликозилирующих свойств некоторых ферментов карбогидраз, в частности эндо-1→3-β-D-глюканаз моллюсков (д.х.н. Л.А. Елякова, Т.Н. Звягинцева, к.х.н. В.В. Сова), и получение с их помощью ферментативно модифицированных полисахаридов, например активной субстанции радиозащитного препарата «Транслам», оказалось важным не только для их биотехнологического применения, но и для дальнейших исследований свойств ряда новых ферментов, выделенных из морских организмов [6]. «Транслам» успешно прошел доклинические испытания.

Открытие высокоактивной щелочной фосфатазы из морской бактерии *Cobetia marina* также имело большое значение для науки. Этот фермент имеет хорошую перспективу применения в составе медицинских препаратов. Он использовался также для синтеза необычных гибридных белков, например гибридного белка, состоящего из порина патогенных бактерий рода *Yersinia* и щелочной фосфатазы [27, 56]. На основе таких гибридных белков можно разрабатывать новые диагностикумы для медицины.

К значимым достижениям в области энзимологии можно отнести и результаты исследований ферментов фукоидан-гидролаз. Были не только открыты новые ферменты этого подподкласса, гидролизующие в основном α-1,4-связи водорослевых полисахаридов, но и получены рекомбинантные ферменты. Показана возможность их применения для ферментативного получения биологически активных фукоолигосахаридов [46]. Таким образом, был разработан новый подход, перспективный для создания лекарств олигосахаридной природы.

Новые подходы к компьютерным расчетам пространственного строения ферментов-гидролаз разработали д.х.н А.К. Мазур (в настоящее время работает во Франции) и его молодые сотрудники.

К.б.н. Б.А. Горшков и И.А. Горшкова выделяли ферменты АТФазы и успешно использовали их для биотестирования морских природных соединений.

В институте с конца 60-х годов прошлого века ведут поиск и изучение метаболитов морских беспозвоночных, что привело к хорошо известным в мировом научном сообществе результатам, отраженным в сотнях статей и патентов. Известно, что именно морские беспозвоночные содержат наиболее разнообразные и многочисленные вторичные метаболиты. Эта область биоорганической химии активно развивается во всем мире, результатом чего стало создание ряда лекарств, в том числе противоопухолевых препаратов нового поколения.

Наш институт занимает лидирующие позиции в мире в области исследований метаболитов иглокожих. В 1973 г. в журнале «Comparative Biochemistry and Physiology» была

опубликована статья Г.Б. Елякова с соавторами, в которой сообщалось, что существует связь между систематическим положением голотурий (один из классов иглокожих) и строением характерных для этой большой группы животных тритерпеновых гликозидов. Вопросы использования таких химических признаков для улучшения систематики голотурий были обсуждены в последующих работах с общим цитированием более 420 раз [33, 40, 61, 63]. Благодаря такому подходу было пересмотрено таксономическое положение целого ряда видов голотурий, начиная с дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (ранее *Stichopus japonicus*), и теперь они известны в мировой литературе как отнесенные систематиками к другим родам животных. Были открыты новые структурные серии метаболитов иглокожих, выделено несколько сотен ранее неизвестных природных соединений этого типа, установлено их химическое строение, изучены биологическая активность и другие свойства (д.х.н. В.И. Калинин, д.х.н. С.А. Авилов, к.х.н. А.С. Сильченко, А.С. Антонов, О.А. Дроздова). В 70–80-е годы прошлого века в этой работе принимали активное участие к.х.н. И.И. Мальцев, Ш.Ш. Афиятулло, ушедшие из жизни В.Ф. Шарыпов, д.б.н. В.С. Левин и др. Метаболиты еще одного класса иглокожих – морских звезд – также оказались очень необычными и по своему строению, и по проявляемой ими активности. Установление строения нескольких сотен новых метаболитов из морских звезд показало, что для этих животных характерно чрезвычайное структурное разнообразие полярных стероидов (д.х.н. А.А. Кича, к.х.н. Н.В. Иванчина, Э.В. Левина, Т.В. Малиаренко). Это разнообразие проанализировано в трех обзорных статьях [21, 38, 62] с общим цитированием около 300.

Метаболиты морских ежей (этот класс также принадлежит к типу иглокожих) были изучены О.Б. Максимовым [11] и С.А. Федоревым совместно с сотрудниками ЛХПХС к.х.н. Е.А. Кольцовой, Н.П. Мищенко и др. Прежде всего они изучили нафтохиноидные пигменты (эхинохром А и спинохромы) из дальневосточных видов морских ежей. Установлено, что эти вещества проявляют антиоксидантные свойства и другие виды физиологического действия [2]. На основе эхинохрома А были созданы лекарственные препараты серии «Гистохром» [32]. Недавно молодая сотрудница этой лаборатории Е.А. Васильева блестяще защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук, значительно расширившую научные сведения об этой группе природных веществ. Лаборатория в последние годы активно сотрудничает в исследовании физиологической активности хиноидных пигментов морских ежей с учеными из Республики Корея.

Д.х.н. С.Н. Федоров изучил биологически активные вещества еще одного класса иглокожих – *Orphiuroidea* (так называемые офиуры или змеехвостки) – и выделил серию новых полярных стероидов. Он же открыл необычный сесквитерпеноид аплидактон, в структуре которого имеется несколько четырехчленных циклов [34]. К.х.н. Н.К. Уткина нашла в офиурах еще одно необычное природное соединение – окисленное производное известного алкалоида трипантрина, которое она назвала офиуроидином [65]. Она же выделила несколько новых алкалоидов из губок.

Однако значительно больше, чем в офиурах, новых соединений было открыто в губках и асцидиях. Так, д.х.н. Т.Н. Макарьевой и ее коллегами к.х.н. Л.К. Шубиной, А.Г. Гузий, К.М. Табакмахер и др. из некоторых губок были выделены необычные биполярные (двухголовые) липиды – ризохалин и его аналоги, меланозины и меланозиды [36, 51, 54]. Этой же группой сотрудников впервые были получены новые алкалоиды, в том числе пибоцин [49, 50], названный в честь института (PIBOC – аббревиатура его названия на английском), монанхоцидинин [37] и родственные ему вещества, 5-азаиндольные соединения гиттаррины [35], в том числе необычное алюминийорганическое производное гиттаррина А. Научная группа Т.Н. Макарьевой нашла и изучила необычные стеринны и их трисульфатированные производные, такие как сокотрастерин сульфат [52], а также высокотоксичные в отношении опухолевых клеток варацины В–С [53] и другие биоактивные метаболиты губок и асцидий. К.х.н. Е.Г. Ляховой и С.А. Колесниковой недавно найдены и

исследованы морские алкалоиды с неизвестными ранее скелетными системами, например лизодендориновые кислоты [48].

Новые терпеноиды из кишечнорастворимых (альционарии, горгонарии) были изучены к.х.н. И.И. Капустиной.

Еще одним источником низкомолекулярных физиологически активных морских природных соединений являются морские микроорганизмы. Их изучение в институте началось после создания в 1985 г. лабораторий морской микробиологии и химии микробных метаболитов. Возглавили эту работу член-корреспондент РАН В.В. Михайлов и к.х.н. Т.А. Кузнецова. Сотрудники ЛХММ выделили из морских бактерий несколько поверхностно-активных метаболитов – липодепептидов. Поиск новых антибиотиков из морских бактерий ведет к.х.н. Н.И. Калиновская в сотрудничестве с д.б.н. Л.А. Романенко из ЛММ [42, 59]. Одна из высокоцитируемых работ лаборатории того времени [31] касалась очень интересного биологического явления – симбиоза, весьма характерного для морских организмов. Из морской губки *Dysidea*, собранной у берегов Восточного Самоа во время 9-го рейса НИС «Академик Опарин» (1989 г.), была выделена бактерия *Vibrio* sp., которая продуцировала противомикробные бромированные дифениловые эфиры, до этого считавшиеся характерными метаболитами некоторых морских губок. Таким образом, стало очевидно, что некоторые метаболиты морских беспозвоночных на самом деле являются продуктами биосинтеза, протекающего в живущих в них симбионтных бактериях. Аналогичные данные приблизительно в это же время появились и в публикациях японских, американских и других исследователей. Было показано, например, что токсин ядовитых рыб фугу (тетродотоксин) синтезируется симбионтными бактериями, заселяющими внутренние органы этих рыб.

После ухода из жизни Т.А. Кузнецовой работы ЛХММ были продолжены под руководством к.х.н. Ш.Ш. Афиятуллова, О.Ф. Сметанина, к.х.н. А.Н. Юрченко, О.И. Журавлева, М.П. Соболевская и др. выделили из морских изолятов микроскопических грибов и очистили многие десятки новых биологически активных соединений, в том числе описанных в высокоцитируемых работах [25, 72].

В наземных дальневосточных растениях также были найдены новые и ранее известные высокоактивные метаболиты. В основном эту работу выполняли сотрудники ЛХПХС (к.х.н. Н.И. Кулеш, М.В. Веселова и др.). Наиболее впечатляющим результатом этой работы с участием ЛХТР (академик РАН П.Г. Горовой) и КАД (к.х.н. Н.П. Красовская) было создание медицинского гепатозащитного препарата «Максар», внедренного в промышленное производство [17]. ЛХПХС в течение многих лет успешно сотрудничала с биотехнологами из Биолого-почвенного института ДВО РАН (ныне – Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН). Совместно были созданы каллусные культуры из дальневосточных растений, продуцирующие большие количества биологически активных производных антрахинона [28], известного антиоксиданта резвератрола [44] и других важных для медицины веществ. В последние годы несколько новых интересных соединений из наземных растений были выделены к.х.н. Л.П. Пономаренко (ЛХМПС) (см., например [57]).

Классические работы по изучению морских липидов, начатые в институте в 60-е – начале 70-х годов прошлого века (член-корреспондент РАН В.Е. Васьковский и др.), привели к разработке реагента для обнаружения фосфолипидов (так называемый реагент Васьковского) [66] и техники применения двумерной тонкослойной хроматографии в липидологии [64]. Публикации этих материалов были процитированы в мировой литературе более 600 раз. Последующие работы, направленные на изучение широко распространенных морских липидов, в нашем институте выполняли к.х.н. С.В. Исай и др. Ряд интересных методических работ, связанных с изучением липидов глубоководных губок, опубликовала к.х.н. Е.А. Санталова (см., например, [60]).

Таким образом, в результате многолетней работы в институте была получена огромная, как сегодня принято говорить, «библиотека» низкомолекулярных биологически активных

веществ с самыми различными биологическими свойствами: от антиоксидантов до соединений с противомикробными и противоопухолевыми свойствами.

В ряде других лабораторий института были выделены биополимеры, не менее интересные и перспективные, чем низкомолекулярные метаболиты. Большинство из них имеют белковую или полисахаридную природу. Так, сотрудниками ЛХФ (д.х.н. Э.П. Козловская, д.х.н. М.М. Монастырская, к.х.н. Е.В. Лейченко, И.Н. Гладких, к.ф.-м.н. Е.А. Зелепуга и др.) выполнены впечатляющие исследования пептидных токсинов из морских анемонов (актиний) [7, 10]. Эти вещества имеют молекулярную массу от 4 до 20 тыс. дальтон. Были получены многочисленные природные нейротоксины, актинопорины и ингибиторы протеаз, в том числе соответствующие рекомбинантные пептиды. Изучено взаимодействие этих веществ с их молекулярными мишенями, включая ферменты, рецепторы и ионные каналы. Перспективными для применения в медицине являются такие пептидные соединения, которые обладают противоболевой активностью и обнаруживаются методами молекулярной биологии. Найдены специфичные ингибиторы различных рецепторов и ионных каналов.

В ЛХНИ (д.х.н. П.А. Лукьянов, к.б.н. О.В. Черников, В.И. Молчанова, И.В. Чикаловец и др.) открыт новый класс лектинов, выделенных из моллюсков [29, 30]. Лектины – это гликопротеины, которые специфически связывают моно- и олигосахариды и гликоконъюгаты. В результате углевод-белкового взаимодействия, осуществляемого лектинами, происходят регуляция биохимических процессов и защита организмов-продуцентов от патогенов. Эти уникальные биомолекулы поддерживают клеточный гомеостаз и регулируют иммунные процессы. Лектины являются ценными молекулярными инструментами для диагностики некоторых заболеваний и исследований в области экспериментальной цитологии и некоторых других сферах науки. Лабораторией были разработаны методы твердофазного лектин-ферментного анализа для диагностики онкологических заболеваний. Некоторые диагностикумы на основе антигенов опухолей трофобласта, созданные в институте (д.х.н. А.Ф. Павленко, к.х.н. А.В. Курика, А.А. Булгаков и др.), уже применяются в медицине.

Исследования полисахаридов морских грамотрицательных бактерий в ЛХНИ (к.х.н. М.С. Кокоулин) [45], а ранее в лаборатории углеводов и липидов привели к выделению десятков полисахаридов и липополисахаридов (к.х.н. С.В. Томшич, Н.А. Командрова, ушедшие из жизни к.х.н. Е.Л. Назаренко, к.х.н. В.А. Зубков и др.). При этом многие из этих веществ существенно отличались по своему строению и свойствам от соответствующих метаболитов из бактерий наземного происхождения (д.х.н. И.Н. Красикова и др. [9]).

Полисахариды красных водорослей исследуют д.х.н. И.М. Ермак, к.х.н. Е.В. Соколова, А.О. Кравченко, А.О. Бянкина, А.В. Володько и другие сотрудники ЛМОАБИ. Ими изучены каррагинаны, выделенные из дальневосточных красных водорослей семейств *Tichosagraceae* и *Gigartinales* [68], при этом открыта новая структурная группа таких полисахаридов. Показано, что каррагинаны способны защищать экспериментальных животных от токсического действия бактериальных эндотоксинов. Выполнены ограниченные клинические испытания их действия на показатели систем гемостаза, гомеостаза и иммунитета у больных острыми кишечными инфекциями и рекомендовано использовать разработанную в лаборатории БАД «Каррагинан-ДВ» дополнительно к базовой терапии таких пациентов. Изучены комплексы каррагинанов с хитозаном и их свойства (к.х.н. В.Н. Давыдова, к.х.н. В.И. Горбач).

Многочисленные и структурно разнообразные полисахариды из бурых водорослей, а также деградирующие их ферменты были получены и исследованы в ЛХФ (д.х.н. Т.Н. Звягинцева, С.П. Ермакова, М.И. Кусайкин, И.Ю. Бакунина, к.х.н. В.В. Сова, Н.М. Шевченко, П.В. Безукладников, к.х.н. А.С. Сильченко, О.С. Маляренко, Р.В. Усольцева, Т.И. Имбс и др.) [23, 67]. Показано, что такие полисахариды обладают противоопухолевыми свойствами, перспективны для создания на их основе лекарственных препаратов.

Изучение строения разнообразных природных соединений сопровождалось выявлением их биологической активности и молекулярных механизмов действия. В ЛБМДБАВ под руководством д.б.н. Д.Л. Аминина были установлены иммуномодулирующие, цитотоксические, нейропротекторные, противоопухолевые, антивирусные, антикоагулянтные и ростстимулирующие (по отношению к растениям) свойства полученных в институте природных соединений самой различной химической природы (к.б.н. И.Г. Агафонова, к.ф.-м.н. Г.Н. Лихацкая, к.б.н. Е.А. Пислягин, Е.А. Юрченко, Е.А. Чингизова, Е.А. Менчинская и др.) [41, 69]. Были найдены молекулярные мишени, пуриновые рецепторы иммунокомпетентных клеток, при взаимодействии с которыми тритерпеновые гликозиды стимулируют в животных клеточный иммунитет [22]. На основе результатов этих и других исследований был разработан препарат «Кумазид» (совместно с ЛХМПС), успешно прошедший доклинические испытания в качестве иммуностимулирующего средства. Препарат ДВ-47-4, созданный в этой лаборатории, применялся в качестве стимулятора роста растений в сельском хозяйстве. Целый ряд высокоактивных соединений был найден и изучен с помощью клеточных технологий, магнитной томографии, конфокальной микроскопии, компьютерного докинга и других современных методов.

В области молекулярной иммунологии под руководством академика РАН Ю.С. Овдова, а затем д.х.н. Т.Ф. Соловьевой в ЛМОАБИ и к.х.н. Р.П. Горшковой в ЛХУ были изучены структуры и функции компонентов клеточной оболочки грамотрицательных бактерий рода *Yersinia*: липополисахаридов (к.х.н. Н.А. Командрова, к.х.н. С.В. Томшич) и белков (к.х.н. Г.А. Набережных). Исследован липополисахарид-белковый комплекс из бактерий псевдотуберкулеза. Были открыты три белка, связывающиеся с иммуноглобулинами (к.х.н. Е.В. Сидорин), причем один из них был идентифицирован с так называемым секреторным механизмом бактерий, существование которого было предсказано на основе нуклеотидных последовательностей генома, другой – с так называемым шапероном *OmpH/Skp* [18]. Было показано, как различные факторы среды влияют на формирование различных фенотипов иерсиний (на примере *Yersinia pseudotuberculosis*), их химический состав и свойства (к.х.н. С.И. Бахолдина и др.) [26].

Порины ряда грамотрицательных бактерий всесторонне исследованы д.х.н. О.Д. Новиковой, к.м.н. М.П. Исаевым и др. [47]. На основе их работ было разработано несколько тест-систем для диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Такая диагностика успешно прошла клиническую апробацию, она позволяет выявлять заболевание не только в острый период, но и при возникновении вторично-очаговых форм проявления иерсиниозов [4].

В области изучения биологических источников природных соединений и таксономии выдающийся вклад в мировую науку сделан в ЛММ под руководством члена-корреспондента РАН В.В. Михайлова и в ЛХТР под руководством академика РАН П.Г. Горового.

Результатом исследований таксономии, биотехнологического потенциала и экологических свойств морских бактерий и микроскопических грибов стало описание около 200 новых видов и более крупных таксонов, включая роды и даже семейства микроорганизмов. В ЛММ были открыты микроорганизмы с новыми и неожиданными свойствами: способные к размножению почкованием, продуцирующие различные вторичные метаболиты, в том числе антибиотики, убихиноны, продуценты фукоидан-гидролаз, 1,3- β -глюканаз, иммуномодулирующих полисахаридов и т.д. Д.б.н. Е.П. Иванова обнаружила большое фенотипическое разнообразие одного и того же вида бактерий (*Pseudoalteromonas citrea*) из различных мест обитания [39]. Она показала, что род *Bacillus* является гетерогенной группой, состоящей из четырех кластеров и нескольких отдельных видов. Во время своей работы в Австралии она сделала еще несколько впечатляющих открытий: установила, например, что поверхность некоторых насекомых является стерильной и бактерицидной. Ее работы имеют около 11 тыс. цитирований и индекс Хирша более 50. Д.б.н. О.И. Недашковская описала много новых видов бактерий, в том числе принадлежащих к новым родам *Reichenbachia*, *Mesonina*, *Arenicola*, *Algibacter*, *Pibocella* и др. Один из них был назван

в честь нашего института – *Pibocella* [55]. Среди многочисленных таксонов, открытых д.б.н. Л.А. Романенко, обнаружены морские бактерии-экстремофилы, в том числе бактерии, обитающие в очень холодных водах [59]. Ее работы способствовали выделению ряда высокоактивных метаболитов, в том числе новых антибиотиков. Д.б.н. М.В. Пивкин недавно открыл три новых вида, принадлежащих к хорошо изученному роду грибов *Penicillium* [43]. Полученные им из морских изолятов микроскопические грибы активно изучались химиками из ЛХММ, что привело к выделению множества интересных метаболитов.

Успешно работают и другие микробиологи института – к.б.н. В.В. Куриленко, Л.С. Шевченко, Ю.В. Худякова, Н.Н. Киричук.

Изучение таксономии дальневосточных растений под руководством академика РАН П.Г. Горового привело к пересмотру таксономического статуса значительного числа видов высших растений. Описаны новые для науки виды *Orostachys gorovoi* Dudkin & Gontch. (Crassulaceae), *Thymus nakhodkensis* Gorovoi et Dudkin (Fabaceae), *Boechea calcarea* Dudkin (Brassicaceae), новая форма ириса гладкого *Iris laevigata* f. *albo-violacea* Dudkin (Iridaceae). Показано, что многие дальневосточные растения (д.б.н. Э.В. Бойко, к.б.н. С.А. Волкова, И.Г. Гавриленко, Р.В. Дудник, Е.В. Новожилова и др.) и водоросли (к.б.н. О.С. Белоус) пригодны для применения в качестве источников ценных природных веществ, используемых для создания медицинских биопрепаратов, и в биотехнологиях. О многих таксонах и биоактивных метаболитах, содержащихся в таких растениях, опубликованы монографии (например, [5, 12]).

В области органического синтеза в ЛОСПС (руководитель д.х.н. В.Ф. Ануфриев) разработан технологический регламент синтеза эхинохрома А – активной субстанции лекарственных препаратов серии «Гистохром™», используемых в офтальмологии и кардиологии. Осуществлен полный синтез ряда метаболитов высших растений, включая тритерпеноиды из женьшеня *Panax ginseng*, берез (к.х.н. Н.Д. Похило, Л.Н. Атопкина) и циклопентеноидные производные трикетонов из перца *Piper coruscans* (д.х.н. В.Л. Новиков, к.х.н. О.П. Шестаков). Нафтохиноидные соединения из морских ежей и некоторых растений синтезированы д.х.н. В.Ф. Ануфриевым, д.х.н. В.Л. Новиковым [24], к.х.н. С.Г. Полонином, Д.Н. Пелагеевым, Ю.Е. Сабуцким, Г.И. Мельман, алкалоиды из асцидий и губок и их аналоги – д.х.н. В.Л. Новиковым, О.С. Радченко, к.х.н. Н.Н. Баланевой [58], метаболиты лишайников – к.х.н. Д.Н. Пелагеевым, К.Л. Борисовой [15]. Разработаны методы региоселективного гликозилирования, метилирования, бромирования, иодирования соединений из нескольких структурных групп природных соединений – нафтохиноидных производных, моносахаридов (д.х.н. Е.В. Евтушенко и др.). Получены многочисленные органические соединения, показавшие те или иные виды перспективной биологической активности.

Исследования в области генетической и белковой инженерии проводят сотрудники ЛМБ к.м.н. М.П. Исаева, к.б.н. Л.А. Балабанова и др. Ими выполнено полногеномное секвенирование нескольких описанных в институте видов морских бактерий, уточнено строение активных сайтов ряда морских ферментов, получены рекомбинантные и гибридные белки, установлены строение и особенности функционирования генов, кодирующих порины, оксидоскваленциклазы и другие ферменты. Разработан метод дифференциальной диагностики заболеваний человека, вызванных бактериями рода *Yersinia*, в том числе возбудителями чумы и псевдотуберкулеза, который основан на применении полимеразной цепной реакции [20]. В настоящее время это направление исследований является одним из самых перспективных в институте.

Над созданием способов промышленного и полупромышленного производства биопрепаратов в институте работает лаборатория биотехнологии (д.б.н. А.А. Артюков). Совместно с другими лабораториями – разработчиками активных субстанций здесь были созданы технологии производства лекарственных препаратов «Максар», «Гистохром» и др. [19]. Разработанные технологии применяются на опытно-промышленной установке ТИБОУ, а также на промышленных фармацевтических и пищевых предприятиях страны.

Группа сотрудников этой лаборатории во главе с д.б.н. А.М. Поповым занимается созданием новых пищевых добавок, продуктов функционального питания и лекарственных препаратов, главным образом противоопухолевого и антиоксидантного действия [16].

В институте успешно применяют современные варианты ЯМР-спектроскопии (к.х.н. В.В. Исаков, д.х.н. А.И. Калиновский, к.х.н. В.А. Денисенко и др.), масс-спектрометрии, включая тандемную масс-спектрометрию МС-ЖХ и МС-ГЖХ, масс-спектрометрию высокого разрешения с разными вариантами ионизации. Данные методы используются для изучения как низкомолекулярных соединений, так и биополимеров (к.х.н. П.С. Дмитренко, Р.С. Попов, С.Д. Анастюк, Ю.Н. Елькин и др.). Ученым института доступны также методы оптической спектроскопии (к.х.н. В.П. Глазунов и Н.Ю. Ким) и расчетные компьютерные методы для определения пространственных особенностей биомолекул (Д.В. Бердышев). Без развития физико-химических методов исследования невозможны были бы успехи других лабораторий.

Таким образом, за 55 лет работы в институте сделано немало открытий и находок, которые оставили след в мировой науке. Об этом свидетельствует частота цитирования публикаций его сотрудников – до 3 тыс. в год. Это самый высокий показатель среди научных учреждений Дальнего Востока России. Выполненные на хорошем уровне фундаментальные исследования служат основой для разработки многочисленных препаратов, нашедших применение в медицине, ветеринарии, косметике, пищевых производствах, а также в качестве молекулярных инструментов для научных исследований в области биохимии, биотехнологии, биомедицины. Существенная часть работ института выполнялась совместно с учеными из других институтов России (ИОХ, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии и Института химии, а также Института эпидемиологии и микробиологии им Г.П. Сомова ДВО РАН), зарубежными учеными из более чем 10 стран мира и нашими сотрудниками, которые сегодня работают в США (к.х.н. В.Г. Воинов и др.), Австралии (д.б.н. Е.П. Иванова), Германии (д.х.н. С.А. Дышловой).

Мы благодарны всем нашим коллегам за сотрудничество и смотрим в будущее с умеренным оптимизмом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Л.А. Исследователь, руководитель, наставник: о В.А. Рассказове // Вестн. ДВО РАН. 2010. № 5. С. 157–161.
2. Богуславская Л.В., Храпова Р.Г., Максимов О.Б. Полигидроксинафтохиноны – новый класс природных антиоксидантов // Изв. АН СССР. Серия хим. 1985. № 7. С. 1471–1476.
3. Васильковский В.Е. У истоков больших начал. – www.ankulikova.blogspot.com/2014/09/xv.html
4. Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Малашенкова В.Г., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Гордеев А.В., Соловьева Т.Ф. Способ дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и иерсиниоза и диагностический набор для его осуществления: пат. 2339952 РФ. Заявл. 29.05.2007; опубли. 27.11.2008, Бюл. № 33.
5. Горовой П.Г. Зонтичные (сем. Umbelliferae Moris.) Приморья и Приамурья. М.: Наука, 1966. 294 с.
6. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В. Ферментативное превращение ламинаранов в 1,3;1,6-Д-глоканы, обладающие иммуностимулирующим действием // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 218–225.
7. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П. Аминокислотная последовательность нейротоксина III из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 302–310.
8. Красикова И.Н. Календарь памятных дат. ТИБОХ ДВО РАН // Вестн. ДВО РАН. 2014. № 1. С. 18–21.
9. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Светашев В.И., Горшкова Р.П., Томшич С.В., Назаренко Е.Л., Командрова Н.А., Иванова Е.П., Горшкова Н.М., Романенко Л.С., Михайлов В.В., Соловьева Т.Ф. Химическая характеристика липида А некоторых морских протеобактерий // Биохимия. 2001. Т. 66, № 9. С. 1286–1294.
10. Лейченко Е.В., Монастырская М.М., Зелепуга Е.А., Ткачева Е.С., Исаева М.П., Лихацкая Г.Н., Анастюк С.Д., Козловская Э.П. Нст-А – новое семейство актинопоринов актинии *Heteractis crispa* // Acta Nat. Т. 6, № 4 (23). С. 95–104.
11. Максимов О.Б. Воспоминания. Владивосток: Тихоокеан. ин-т биоорганической химии ДВО РАН, 2002. 207 с.
12. Максимов О.Б., Кулеш Н.И., Горовой П.Г. Полифенолы дальневосточных растений. Владивосток: Дальневосточная академия наук, 2002. 332 с.

13. Мензорова Н.И., Зинатулин Р.Ф., Фаворов В.В., Расказов В.А. Выделение и исследование свойств Са, Mg-зависимой эндонуклеазы из гепатопанкреаса краба *Paralithodes camtschatica* // Биохимия. 1993. № 58. С. 681–691.
14. Не все, что было, а то, что запомнилось: сб. воспоминаний сотрудников Института / сост. и отв. ред. И.Н. Красикова; Тихоокеан. ин-т биоорган. химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Владивосток: Дальнаука, 2014. 236 с.
15. Новиков В.Л. Синтез и свойства вторичных метаболитов некоторых высших растений и морских беспозвоночных и родственных им соединений. Успехи в изучении природных соединений. Владивосток: Дальнаука, 1999. С. 33–84.
16. Попов А.М., Осипов А.Н., Корепанова Е.А., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Климович А.А. Изучение антиоксидантной и мембранотропной активности эхинохрома А с использованием различных модельных систем // Биофизика. 2017. Т. 62. С. 509–517.
17. Саратиков А.С., Чучалин В.С., Ратькин А.В., Ратькин Е.В., Федорев С.А., Булгаков В.П. Гепатопротективные свойства полифенольных комплексов из древесины и клеточной культуры мааки амурской // Бюл. сиб. мед. 2008. Т. 1. С. 52–55.
18. Сидорин Е.В., Соловьева Т.Ф. IgG-связывающие белки бактерий // Биохимия. 2011. Т. 76, вып. 3. С. 363–378.
19. Стадниченко Н.И. Интеллектуальная собственность ТИБОХ ДВО РАН. Исследования природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Владивосток: Дальнаука, 2013. С. 175–183.
20. Стенкова А.М., Исаева М.П., Расказов В.А. Разработка многопраймерной ПЦР для идентификации бактерий рода *Yersinia* и дифференциации патогенных видов (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2008. № 3. С. 18–23.
21. Стоник В.А. Морские полярные стероиды // Успехи химии. 2001. Vol. 70. P. 673–675.
22. Aminin D., Pisyagin E., Astashev M., Es'kov A., Kozhemyako V., Avilov S., Zelepuga Z., Yurchenko E., Kaluzhskiy L., Kozlovskaya E., Ivanov A., Stonik V. Glycosides from edible sea cucumbers stimulate macrophages via purinergic receptors // Sci. Rep. 2016. Art. Numb. 39683.
23. Anastuyk S.D., Shevchenko N.M., Ermakova S.P., Vishchuk O.S., Nazarenko E.L., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry // Carbohydr. Biopol. 2012. Vol. 87. P. 186–194.
24. 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. Vol. 8. P. 587–592.
25. Afiyatulloev Sh.Sh., Kuznetsova T.A., Isakov V.V., Pivkin M.V., Prokof'eva N.G., Elyakov G.B. New diterpenic alditosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber // J. Nat. Prod. 2000. Vol. 63. P. 848–850.
26. Bakhholdina S.I., Krasikova I.N., Solov'eva T.F., Sanina N.M., Popova O.B. The impact of abiotic factors (temperature and glucose) on physicochemical properties of lipids from *Yersinia pseudotuberculosis* // Biochimie. 2004. Vol. 86. P. 875–881.
27. Balabanova L., Golotin V., Podvolotskaya A., Rasskazov V. Genetically modified proteins: functional improvement and chimeragenesis // Bioengineered. 2015. Vol. 6, N 5. P. 262–274.
28. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Zvereva E.V., Fedoreev S.A., Zhuravlev Y.N. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *roB* and *roC* genes // J. Biotechnol. 2002. Vol. 92. P. 213–221.
29. Chernikov O.V., Wong W.-T., Li L.-H., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Wu S.-H., Liao J.-H., Hua K.-F. A GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanusmodulates* immune response in macrophages and in mice // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. Art. Numb. 6315.
30. Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Pivkin M.V., Molchanova V.I., Litovchenko A.P., Li W., Lukyanov P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus* // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 42. P. 503–507.
31. Elyakov G.B., Kuznetsova T., Mikhailov V.V., Maltsev I.I., Voinov V.G., Fedoreyev S.A. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. // Cell. Mol. Life Sci. Vol. 47. P. 632–633.
32. Elyakov G.B., Maximov O.B., Mischenko N.P., Koltsova E.A., Fedoreev S.A., Glebko L.I., Krasovskaya N.P., Artjukov A.A. Drug preparation «Histochrome» for treating acute myocardial infarction and ischemic heart disease: Pat. 1121930B1 EP. European Patent Office (2007) Int.Cl.7 A 61 K 31/122.
33. Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V., Slanke V.P., Kuznetsova T.A., Levin V.S. Glycosides of marine invertebrates. I. A comparative study of the glycoside fractions of pacific sea cucumbers // Comp. Biochem. Physiol. 1973. Vol. 44B. P. 325–336.
34. Fedorov S.N., Radchenko O.S., Shubina L.K., Kalinovsky A.I., Gerasimenko A.V., Popov D.Y., Stonik V.A. Aplydactone, a new sesquiterpenoid with an unprecedented carbon skeleton from the sea hare *Aplysia dactylomela*, and its cargin-like rearrangement // J. Amer. Chem. Soc. 2001. Vol. 123. P. 504–505.

35. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Gerasimenko A.V., Udovenko A.A., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Golotin V.A., Fedorov S.N., Grebnev B.B., Stonik V.A. Guitarrins A–E and aluminumguitarrin A: 5-azaindoles from the Northwestern Pacific marine sponge *Guitarra fimbriata* // J. Nat. Prod. 2019. Vol. 82. P. 1704–1709.
36. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Popov R.S., Kuzmich A.S., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Kim N.Yu., Stonik V.A. Melonoside B and melonosins A and B, lipids containing multifunctionalized ω -hydroxy fatty acid amides from the Far Eastern marine sponge *Melonanchora kobjakovae* // J. Nat. Prod. 2018. Vol. 81. P. 2763–2767.
37. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Dyshlovoy S.A., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Monanchocidin: A new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // Org. Lett. 2001. Vol. 12. P. 4292–4295.
38. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Stonik V.A. Steroid glycosides from marine organism // Steroids. 2011. Vol. 76. P. 425–454.
39. 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. Microbiol. 1998. Vol. 48. P. 247–256.
40. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A., Smirnov A.V. Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy // Phytochem. Rev. 2005. Vol. 4. P. 221–236.
41. Kalinin V.I., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene glycosides from sea cucumbers (*Holothurioidae, Echinodermata*), biological activities and functions // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products). 2008. Vol. 35. P. 135–196.
42. Kalinovskaya N.I., Ivanova E.P., Alexeeva Y.V., Gorshkova N.M., Kuznetsova T.A., Dmitrenok A.S., Nicolau D.V. Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species // Curr. Microbiol. 2004. Vol. 48. P. 441–446.
43. Kirichuk N.N., Pivkin M.V., Matveeva T.V. Three new *Penicillium* species from marine subaqueous soils // Mycol. Progress. 2017. Vol. 16. P. 15–26.
44. 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. Biotechnol. 2007. Vol. 128. P. 681–692.
45. Kokoulin M.S., Kalinovskiy A.I., Komandrova N.A., Tomshich S.V., Romanenko L.A., Vaskovsky V.E. The sulfated O-specific polysaccharide from the marine bacterium *Cobetia pacifica* KMM 3879^T // Carbohydr. Res. 2014. Vol. 387. P. 4–9.
46. Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N. Fucoidanases // Glycobiology. 2016. Vol. 26. P. 3–12.
47. Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. Homology models of the *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* general porins and comparative analysis of their functional and antigenic regions // J. Biomol. Struct. Dynamics. 2005. Vol. 23. P. 163–174.
48. Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovskiy A.I., Berdyshev D.V., Pisyagin E.A., Kuzmich A.S., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Makarieva T.N., Stonik V.A. Lissodendoric acids A and B, manzamine-related alkaloids from the Far Eastern sponge *Lissodendoryx florida* // Org. Lett. 2017. Vol. 19, N 19. P. 5320–5323.
49. Makarieva T.N., Dmitrenok A.S., Dmitrenok P.S., Grebnev B.B., Stonik V.A. Pibocin B, the first N-O-methylindole marine alkaloid, a metabolite from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* species // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. P. 1559–1561.
50. Makarieva T.N., Ilyin S.G., Stonik V.A., Lyssenko K.A., Denisenko V.A. Pibocin, the first ergoline marine alkaloid from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* sp. // Tetrahedron Lett. 1999. Vol. 40. P. 1591–1594.
51. Makarieva T.N., Denisenko V.A., Stonik V.A., Milgrom Y.M., Rashkes Y.V. Rhizochoalin, a novel secondary metabolite of mixed biosynthesis from the sponge *Rhizochoalina incrustata* // Tetrahedron Lett. 1989. Vol. 30. P. 6581–6584.
52. Makarieva T.N., Shubina L.K., Kalinovskiy A.I., Stonik V.A., Elyakov G.B. Steroids in porifera. II. Steroid derivatives from two sponges of the family. Sokotrasterol sulfate, a marine steroid with a new pattern of side chain alkylation // Steroids. 1983. Vol. 42. P. 267–281.
53. 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. 2004. Vol. 58. P. 254–258.
54. Molinski T.F., Makarieva T.N., Stonik V.A. (–)-Rhizochoalin is a dimeric enantiomeric (2R)-sphingolipid: absolute configuration of pseudo-C_{2v}-symmetric bis-2-amino-3-alkanols by CD // Angew. Chem. Int. Ed. 2000. Vol. 112. P. 4242–4245.
55. Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Lee K.H., Bae K.S., Frolova G.M., Mikhailov V.V., Kim I.S. Pibocella ponti gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from the green alga *Acrosiphonia sonderi* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. Vol. 55. P. 177–181.
56. Plisova E.Yu., Balabanova L.A., Ivanova E.P., Kozhemyako V.B., Mikhailov V.V., Agafonova E.V., Rasskazov V.A. A highly active alkaline phosphatase from the marine bacterium *Cobetia marina* // Mar. Biotechnol. 2005. Vol. 7, N 3. P. 173–178.

57. Ponomarenko L.P., Kalinovsky A.I., Martyyas E.A., Doudkin R.V., Gorovoy P.G., Stonik V.A. Terpenoid metabolites from the aerial part of *Artemisia lagocephala* // *Phytochem. Lett.* 2012. Vol. 5. P. 118–122.
58. Radchenko O.S., Novikov V.L., Elyakov G.B. A simple and practical approach to the synthesis of the marine sponge pigment fascaplysin and related compounds // *Tetrahedron Lett.* 1997. Vol. 38. P. 5339–5342.
59. Romanenko L.A., Schulman P., Rohde M., Lysenko A.M., Mikhailov V.V., Stackebrandt E. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. Vol. 52. P. 1291–1297.
60. Santalova E.A., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S. Structural analysis of the minor cerebrosides from a glass sponge *Aulosaccus* sp. // *Lipids.* 2015. Vol. 50, N 12. P. 1209–1218.
61. Stonik V.A., Elyakov G.B. Secondary metabolites from echinoderms as chemotaxonomic markers // *Bioorganic Mar. Chem.* 1988. Vol. 2. P. 43–86.
62. Stonik V.A., Ivanchina N.V., Kicha A.A. New polar steroids from starfish // *Nat. Prod. Commun.* 2008. Vol. 10. P. 1587–1610.
63. 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. Vol. 8. P. 235–248.
64. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. Asimplified technique for thinlayer microchromatography of lipids // *J. Chromatogr.* 1972. Vol. 67. P. 376–378.
65. Utkina N.K., Denisenko V.A. Ophiuroidine, the first indolo[2,1-b]quinazoline alkaloid from the Caribbean brittle star *Ophiocoma riisei* // *Tetrahedron Lett.* 2007. Vol. 48. P. 4445–4447.
66. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms // *J. Lipid Res.* 1968. Vol. 9. P. 396.
67. Vishchuk O.S., Ermakova T.P., Zvyagintseva T.N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics and antitumor activity // *Carbohydr. Res.* 2011. Vol. 346. P. 2769–2776.
68. Yermak I.M., Kim Y.Y., Titlyanov E.A., Isakov V.V., Solov'eva T.F. Chemical structure and gel properties of carrageenans from algae belonging to the Gigartinaeaceae and Tichocarpaeaceae, collected from the Russian Pacific coast // *J. Appl. Phycol.* 1999. Vol. 11. P. 41–48.
69. Yermak I.M., Barabanova A.O., Aminin D.L., Davydova V.N., Sokolova E.V., Solov'eva T.F., Kim Y.H., Shin K.S. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 87. P. 713–720.
70. 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. Vol. 12. P. 1935–1942.
71. Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Shcheglov A.S., Vagner L.L., Khaspekov G.L., Kozhemyako V.B., Matz M.V., Melishkevich E., Moroz L.L., Lukyanov S.A., Shagin D.A. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease // *Nucl. Acid. Res.* 2004. Vol. 32. P. e37.
72. Zhuravleva O.I., Afiyatullof Sh.Sh., Denisenko V.A., Ermakova S.P., Slinkina N.N., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz // *Phytochem.* 2012. Vol. 80. P. 123–131.

П.С. ДМИТРЕНОК

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН: современное состояние и перспективы развития

В 1964 г. был основан Институт биологически активных веществ, ныне Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Обсуждаются основные направления его исследований, структура, кадровый состав и перспективы развития.

Ключевые слова: ТИБОХ ДВО РАН, природные соединения, химические структуры, биологическая активность, перспективы развития, фармакология.

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences – current status and prospects for development. P.S. DMITRENOK (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

In 1964, the Institute of Biologically Active Substances – now the G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences was founded. The article discusses the main scientific directions of the Institute, its structure, staff and prospects for development.

Key words: PIBOC FEB RAS, natural compounds, chemical structures, biological activity, development prospects, pharmacology.

55 лет назад было принято решение о создании во Владивостоке в Дальневосточном филиале Сибирского отделения АН СССР Института биологически активных веществ (ИнБАВ). Размещение его на юге Дальневосточного региона давало уникальные возможности непосредственного доступа к биологическому сырью и установления и развития научных и технологических контактов с научными организациями стран Азиатско-Тихоокеанского региона и мира. В 1972 г. институт переименован в Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного научного центра АН СССР (ныне – ТИБОХ ДВО РАН). В 2011 г. ему было присвоено имя академика Георгия Борисовича Елякова – в честь своего основателя и бессменного руководителя в течение многих лет.

Создание новых научных учреждений, в том числе ТИБОХ, на Дальнем Востоке России в 60-е годы XX в. являлось вполне продуманным решением и стало многовекторным, дальновидным и успешным проектом. В каких-то аспектах это была репликация чрезвычайно полезного для страны сибирского научного проекта, включающего в себя строительство новосибирского Академгородка и развитие науки в Сибири, – не менее успешного, чем проект Силиконовой долины в США. В то же время это было рискованным начинанием, так как существовали опасения, хватит ли инфраструктурных и человеческих ресурсов для создания эффективных научных институтов, не превратятся

ДМИТРЕНОК Павел Сергеевич – кандидат химических наук, директор института, заведующий лабораторией инструментальных методов исследований (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). E-mail: paveldmt@piboc.dvo.ru

ли они в захолустные учреждения, годные лишь для галочек в отчетах руководителей. Неясно было, удастся ли собрать и подготовить необходимое число квалифицированных кадров. Эти опасения не оправдались. Создание первой очереди институтов стимулировало прогресс образования, в первую очередь развитие и создание соответствующих факультетов и кафедр в Дальневосточном государственном университете и других вузах региона. В Приморском крае стало увеличиваться количество специалистов, способных работать в науке и на высокотехнологичных производствах. В результате реализации этого проекта появившиеся крупные институты стали конкурентоспособными на мировом уровне, среди которых одним из лучших стал Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова.

Институт создавали молодые люди, директору-основателю Г.Б. Елякову в год открытия института в 1964 г. было 35 лет. Первые сотрудники приезжали во Владивосток со всей страны, но постепенно кадровую основу, «золотой фонд», составили выпускники химического, биологического и физического факультетов ДВГУ и других дальневосточных вузов. Руководители института и заведующие лабораториями ставили очень высокие научные планки для своих молодых коллег, многих посылали на стажировки в ведущие научные центры страны для обучения и приобретения опыта.

Здесь, на месте, во Владивостоке, все надо было делать самим: планировать исследования, разрабатывать и совершенствовать методики, выбирать объекты для изучения, создавать современную приборную и технологическую базу и, конечно, определять место и строить отдельное здание для института. Без энтузиазма и беззаветного труда всех сотрудников ТИБОХ создать такое крупное и успешное научное учреждение было бы невозможно. Руководители института анализировали и учитывали опыт работы других институтов Академии наук СССР, лично работали в передовых научных организациях своего профиля, развивали межинститутское и международное сотрудничество. Комплексность задачи поиска новых биологически активных веществ требовала привлечения широкого круга специалистов – химиков, биологов, технологов, физиков, морских биологов, ботаников, водолазов и др. Взаимодействие рождало новые идеи, они требовали новых решений – так создавалась инфраструктура института. Академик Георгий Борисович Еляков возглавлял ТИБОХ более 37 лет, затем на посту директора его сменил академик Валентин Аронович Стоник, под руководством которого в течение 17 лет значительно окрепли научные позиции института.

В настоящее время ТИБОХ ДВО РАН обладает прочной мировой репутацией в области структурно-химической биологии, развитой инфраструктурой, высококлассными специалистами и уникальным опытом в проведении океанских научных экспедиций, создании и эксплуатации опытных производств и морских станций. Основная фундаментальная задача, решаемая институтом, заключается в установлении точных химических структур природных и синтетических низкомолекулярных метаболитов и биополимеров, и она с большой вероятностью будет актуальной еще в течение многих лет. Открытие новых природных соединений, в том числе и биологически активных, и их источников, создание на их основе современных лекарственных препаратов, установление механизмов их действия, поиск возможных практических применений найденных соединений (для медицины, сельского хозяйства, ветеринарии и других областей народного хозяйства) являются приоритетами института.

С самого начала исследования в институте велись с применением наиболее современных методов. Необходимыми условиями для этого были создание и развитие приборного парка для выделения индивидуальных веществ, получение информации о структуре и свойствах найденных природных соединений, их биогенезе, перспективах практического применения и т.д. С большим трудом, поскольку финансирования не хватало всегда, в институте была создана современная материально-техническая база, обучены и воспитаны высококвалифицированные специалисты – вот почему он стал одним из лидеров мировой науки в своей области. Организация в 1966 г. Морской экспериментальной

станции ТИБОХ в бухте Троицы зал. Петра Великого Японского моря в Хасанском районе Приморского края как постоянной базы для исследования морских организмов в экспедиционных условиях, а также строительство в 1985 г. специализированного научно-исследовательского судна биохимического профиля «Академик Опарин», которое обеспечило исследования морских организмов в самых различных зонах Мирового океана, также сильно укрепили позиции института, значительно расширив глубину и географию исследований.

В настоящее время в ТИБОХ ДВО РАН работают 317 человек, в том числе 145 научных сотрудников, среди которых 2 академика РАН, 1 член-корреспондент РАН, 30 докторов наук и 90 кандидатов наук.

Сейчас в состав института входят:

отдел химии и биохимии низкомолекулярных биорегуляторов, включающий 8 лабораторий: химии микробных метаболитов, химии морских природных соединений, химии пептидов, химии природных хиноидных соединений, органического синтеза природных соединений, биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ, микробиологии, а также недавно созданную лабораторию молекулярной фармакологии и биомедицины;

отдел молекулярной иммунологии, состоящий из лабораторий химии неинфекционного иммунитета и молекулярных основ антибактериального иммунитета;

организационно самостоятельные лаборатории хемотаксономии, химии ферментов, биотехнологии, морской биохимии, физико-химических методов исследования;

научно-вспомогательные подразделения: отделы патентный, аспирантуры и докторантуры, научной информации, контрольно-аналитический, морских экспедиционных работ; группы компьютерных технологий, инноваций; виварий; Морская экспериментальная станция (МЭС); опытная экспериментальная установка.

В институте успешно работают Дальневосточный центр структурных молекулярных исследований (ЦСМИ, или ЦКП ЯМР- и масс-спектрометрии ТИБОХ) и уникальная Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН (КММ), специализирующаяся на морских гетеротрофных бактериях и грибах-микромикетах, собранных почти во всех регионах Мирового океана в течение почти 40 лет.

ТИБОХ ДВО РАН является институтом I категории. Главными направлениями исследований ТИБОХ являются химия природных соединений, морская биоорганическая химия и биотехнология, энзимология, молекулярная иммунология, молекулярная генетика и морская микробиология. Полученные научные результаты публикуются в ведущих российских и международных научных журналах (так, в 2018 г. вышли в свет 112 научных статей в журналах, индексируемых базой данных Web of Science, и 264 – РИНЦ), используются для создания новых лекарств, диагностикумов, биологически активных добавок к пище, ветеринарных препаратов, косметики, функциональных продуктов питания. Только за последние десять-пятнадцать лет усилиями наших ученых появилось около двух десятков научно-технических разработок, доведенных до уровня технологических регламентов и инновационных проектов. Наиболее значимыми среди них являются лекарственные препараты серии Гистохром на основе природного антиоксиданта эхинохрома для кардиологии и офтальмологии, гепатозащитный препарат Максар®, комплекс протеолитических ферментов для очищения ран различной этиологии Коллагеназа КК®, Продолжаются исследования потенциальных лекарственных средств – Кумазида для коррекции иммунодефицитных состояний, Коурохитина как противовоспалительного средства и Гистохрома синтетического. В ТИБОХ созданы и производятся биологически активные добавки, в частности Каррагинан-ДВ и серия препаратов Фуколам® – на основе полисахаридов водорослей. Использование для их производства сырьевой базы Дальневосточного региона определяет их конкурентоспособность как на отечественном, так и на зарубежном рынках.

В последние годы в институте интенсивно развиваются и в дальнейшем будут все более широко использоваться так называемые омиксные технологии, в том числе геномные, протеомные, пептидомные и метаболомные исследования. Эти современные подходы основаны на высокочувствительных и селективных системах анализа и обработки громадного количества аналитических данных. Данные подходы позволяют характеризовать биологические объекты на уровне молекулярных профилей, оценить и сделать доступным изучение природного и химического биоразнообразия. Без применения таких методов невозможно детальное изучение биосинтеза и механизмов действия фармакологически активных веществ, понимание функций метаболитов и их биологического значения в определенной биологической системе. В нашем институте впервые в России были исследованы метаболомные профили ряда биологически активных гликозидов морских иглокожих, изменения количественного и качественного состава метаболитов в зависимости от различных экологических факторов. Протеомные исследования, проведенные с участием сотрудников института, позволили прояснить механизмы действия ряда перспективных для применения в медицине противоопухолевых и иммуномодулирующих соединений. Так, анализ изменений протеомных профилей опухолевых клеток под действием биологически активных природных соединений, выделенных в нашем институте, показывает, какие клеточные процессы затрагиваются при этом. Начаты работы по полному секвенированию генома уникальных морских бактерий из КММ ТИБОХ – продуцентов необычных биологически активных веществ. Изучение геномов бактерий и метагеномов морских биологических сообществ открывает перспективы для понимания филогенеза изучаемых биологических объектов и специализации этих организмов в биоценозах, открытия новых ферментов, развития морской биотехнологии.

Работы с использованием «омиксных» технологий имеют большую перспективу для создания новых фармацевтических препаратов. Необходимость интенсификации таких исследований и расширения использования современных технологий для создания новых лекарственных средств обусловлено созданием в 2018 г. лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины. Ее направленность – широкомасштабный поиск, получение и углубленное изучение биомедицинских свойств морских природных соединений на различных клеточных моделях и лабораторных животных, а также установление их взаимодействия с молекулярными мишенями (рецепторами, ионными каналами, ключевыми ферментами, сигнальными каскадами).

В 2018 г. ТИБОХ ДВО РАН разработал новую программу развития на 2019–2023 гг. «Фундаментальные исследования природных соединений в целях научно-технического развития и национальной безопасности Российской Федерации». Целью разработанной Программы является развитие научно-материальной базы для осуществления прорывных фундаментальных исследований в области биоорганической химии, биохимии, молекулярной иммунологии, органического синтеза природных соединений, морской микробиологии, систематики высших растений и биотехнологии с последующей разработкой новых технологий создания лечебных и лечебно-профилактических средств и диагностических методов. Эта программа направлена на обеспечение решения государственных задач по актуальным направлениям научно-технологического развития Российской Федерации и национального проекта «Наука».

В рамках данной программы будут получены новые данные о строении, структуре и функциях большого числа природных соединений, установлены структурно-функциональные взаимосвязи и изучены механизмы действия биологически активных соединений, обладающих биомедицинским потенциалом, выявлены конкретные мишени реализации их физиологической активности и разработаны технологии получения новых лекарственных средств и биологически активных добавок, а также предложены новые применения (репозиционирование) для разработанных ранее лекарственных субстанций. Полученные научные результаты позволят предложить пути решения ряда проблем, связанных с созданием новых высокоспецифичных препаратов направленного действия для

повышения эффективности терапии патологических процессов различной этиологии и обеспечат реализацию нескольких приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, основным из которых является переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям сбережения здоровья.

Все последние годы активно развиваются совместные исследования ТИБОХ с российскими и зарубежными научными организациями, в то же время потенциал такого взаимодействия с российскими институтами, а также с институтами Китайской Народной Республики, Республики Корея, Социалистической Республики Вьетнам, Индии, стран Европы, США далеко не исчерпан.

В институте бережно относятся к квалифицированным кадрам и воспитывают молодых ученых в лучших традициях отечественной науки. Наши сотрудники активно участвуют в образовательных программах Дальневосточного федерального университета, в том числе на кафедре биоорганической химии и биотехнологии Школы естественных наук. Привлечение студентов и аспирантов к научным изысканиям – важнейшей и эффективный метод пополнения кадров ТИБОХ, залог его будущего развития. Необходимо отметить, что создание новой Лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины позволило добиться выделения 15 ставок для молодых сотрудников. Институт планирует активное участие в создании Научно-образовательного центра в Приморском крае и использовании в своих исследованиях синхротрона на о-ве Русский.

В заключение хочется поздравить коллектив ТИБОХ ДВО РАН с юбилеем и пожелать новых научных открытий.

Н.В. ИВАНЧИНА, А.А. КИЧА, Т.В. МАЛЯРЕНКО,
А.И. КАЛИНОВСКИЙ, П.С. ДМИТРЕНОК, В.А. СТОНИК

Исследования полярных стероидов морских звезд: структуры, биологические активности, биологическая роль, биосинтез

Изучены полярные стероидные соединения ряда морских звезд, собранных в различных районах Мирового океана. Исследованы их структуры, биологические активности, биологическая роль и биосинтез. Найдены новые полярные стероиды, имеющие редкие и уникальные структурные фрагменты.

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

Studies of starfish polar steroids: structures, biological activities, probable biological function, biosynthesis.
N.V. IVANCHINA, A.A. KICHA, T.V. MALYARENKO, A.I. KALINOVSKIY, P.S. DMITRENOK, V.A. STONIK
(G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

Some results of the studies of polar steroid compounds from starfish collected in various geographical areas of the World Ocean were discussed. Structures, biological activities, possible biological role and biosynthesis of starfish polar steroids were investigated. New natural compounds with rare and unique structural fragments were found.

Key words: starfish, polyhydroxysteroids, glycoside, structure, biological activity, biological function, biosynthesis.

Морские звезды (класс Asteroidea, тип Echinodermata) являются богатым источником разнообразных по своему химическому строению полярных стероидов, которые значительно отличаются от стероидных метаболитов наземных растений и других животных, в том числе морских, что свидетельствует о необычных путях их биосинтеза. К основным группам полярных стероидных соединений морских звезд относятся полигидроксистероиды (окисленные стероидные соединения, имеющие от четырех до девяти гидроксильных групп в стероидном ядре и боковой цепи) и стероидные гликозиды. Основными группами стероидных гликозидов являются астросапонины – олигогликозиды с углеводной цепью, состоящей из 4–6 моносахаридных остатков при C-6 3-*O*-сульфатированного $\Delta^{9(11)}$ -3 β ,6 α -дигидроксистероидного агликона, а также гликозиды полигидроксистероидов, в которых один, два, реже три моносахаридных остатка присоединены к полигидроксилированному стероидному агликону. Полярные стероидные соединения морских звезд могут

*ИВАНЧИНА Наталья Владимировна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией, КИЧА Алла Анатольевна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, МАЛЯРЕНКО Тимофей Владимирович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, КАЛИНОВСКИЙ Анатолий Иванович – доктор химических наук, главный научный сотрудник, ДМИТРЕНОК Павел Сергеевич – кандидат химических наук, заведующий лабораторией, СТОНИК Валентин Аронович – доктор химических наук, академик РАН, научный руководитель института (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: ivanchina@piboc.dvo.ru

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00034.

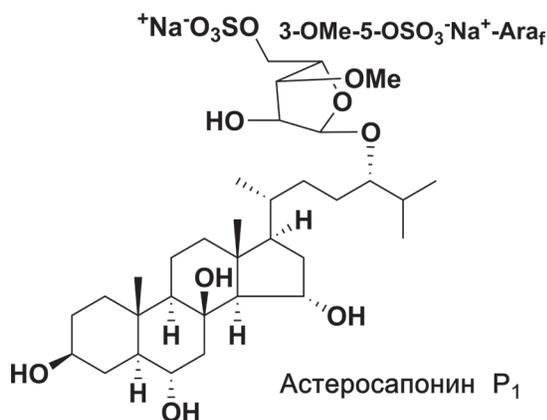


Рис. 1. Структура стероидного гликозида астеросапонина P₁ из морской звезды *Patiria pectinifera*

встречаться как в сульфатированной, так и в несульфатированной формах. Подобные полярным стероидам морских звезд соединения в других классах иглокожих (Crinoidea, Ophiuroidea, Echinoidea, Holothurioidea) не найдены, поэтому они могут служить своеобразными таксономическими маркерами класса Asteroidea. Кроме того, полярные стероиды морских звезд проявляют различные виды биологической активности, включая гемолитическую, противомикробную, противовирусную, противоопухолевую, канцерпревентивную, нейритогенную, и другие свойства.

Исследования полярных стероидов морских звезд были начаты в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН в конце 70-х годов XX в. Первые публикации о структурах этих соединений появились в начале 1980-х годов и касались выделения серии полигидроксистероидов и стероидного монозида астеросапонина P₁ (рис. 1) из широко распространенной у берегов Приморского края морской звезды *Patiria pectinifera* [1, 5]. Для установления строения этого гликозида были применены ЯМР-спектроскопия, а также химические методы, в том числе кислотный гидролиз, окисление, гидрирование, десульфатирование, ацетилирование. В настоящее время структуры полярных стероидов выявляют в основном с помощью современных физико-химических методов, таких как одно- и двумерная спектроскопия ЯМР (DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC, NOESY, ROESY, H2BC и 1D TOCSY) и масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ИЭР), включая масс-спектрометрию тандемную и высокого разрешения. В то же время применение химических трансформаций для установления моносахаридного состава гликозидов или определения абсолютной стереохимии молекул по-прежнему актуально.

Нами из различных видов морских звезд, собранных в тропических и северных районах Мирового океана, выделено около 200 новых полярных стероидов, принадлежащих к разным структурным группам, установлено их строение, включая абсолютную стереохимию, для ряда из них определена биологическая активность. Большинство выделенных нами соединений относятся к полигидроксистероидам и родственным им гликозидам полигидроксистероидов. В последние годы расширяются структурные исследования астеросапонинов.

Нами были найдены полярные стероиды, которые можно отнести к редким и(или) новым структурным группам. Так, уникальные стероидные ионные гибриды, так называемые алкалоидостероиды (рис. 2), обнаружены в дальневосточной морской звезде *Lethasterias nanimensis chelifera* [4]. Они представляют собой нативные агликоны астеросапонинов, сульфаты астерона, изоастерона и торнастерина А, находящиеся в виде органических

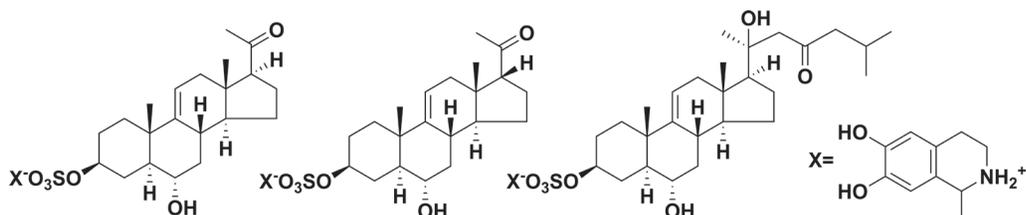


Рис. 2. Структуры алкалоидостероидов из морской звезды *Lethasterias nanimensis chelifera*

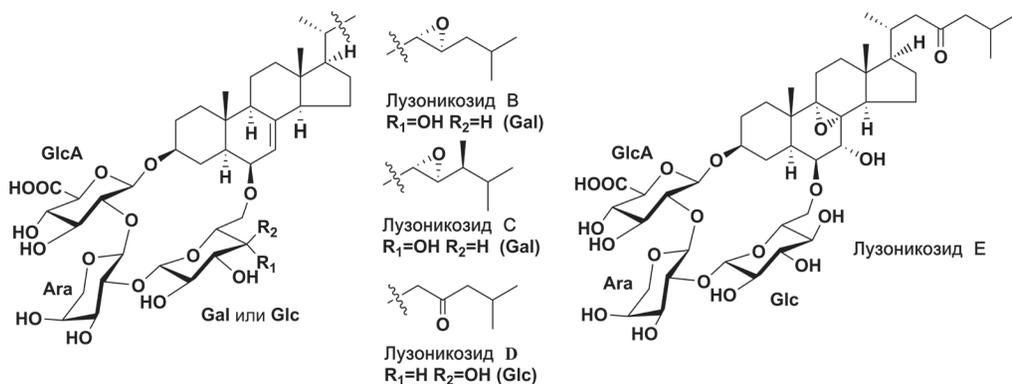


Рис. 3. Структуры лузоникидов В–Е из морской звезды *Echinaster luzonicus*

анионов с другим органическим противоионом – катионом салсолинола (1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина).

Из морской звезды *Echinaster luzonicus*, собранной у побережья Вьетнама, выделены лузоникиды В–Е (рис. 3), принадлежащие к редкой структурной группе циклических стероидных гликозидов, имеющих Δ^7 -3 β ,6 β -дигидроксистероидный агликон и углеводную цепь, замкнутую в макроцикл [6]. Их выделение почти вдвое увеличило число представителей этой уникальной структурной группы морских полярных стероидов.

В тропических морских звездах рода *Anthenea* обнаружена большая серия редких антенозидов – гликозидов, имеющих необычные структурные фрагменты, а именно: стероидные агликоны, гликозилированные по положениям С-16 или одновременно С-16 и С-7 и имеющие $\Delta^{8(14)}$ -3 β ,4 β ,6 β ,7 β ,16 α -пентагидрокси- или $\Delta^{8(14)}$ -3 β (α),6 β ,7 β ,16 α -тетрагидроксистероидные ядра, неокисленные боковые цепи и редкие для гликозидов морских звезд моносахаридные остатки. Из морских звезд *A. aspera* и *A. sibogae* выделено 19 новых гликозидов [9, 11, 13]. Структуры нескольких антенозидов приведены на рис. 4. Были изучены цитотоксическая и канцерпревентивная активности для ряда выделенных соединений [9, 11–13].

Из морской звезды *Choriaster granulatus* выделен уникальный гранулатозид С – гликозид, в котором сочетаются характерные структурные особенности полярных стероидов из нескольких разных типов морских беспозвоночных [2]. Недавно в морской звезде *Pentacaster regulus* обнаружены астеросапонины пентарегулозиды В и С с фураностановыми агликонами, характерными для наземных растений, не найденные среди морских олигогликозидов (рис. 5). Пентарегулозид С на клеточном уровне проявил иммуномодулирующее действие [7].

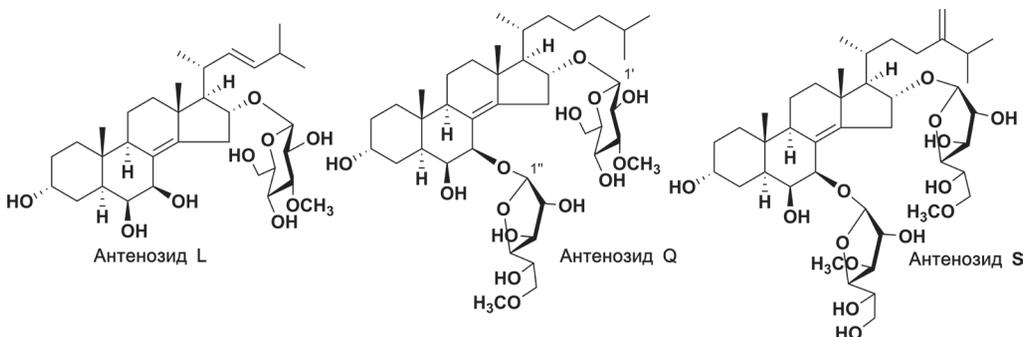


Рис. 4. Структуры антенозидов L, Q и S из морской звезды *Anthenea aspera*

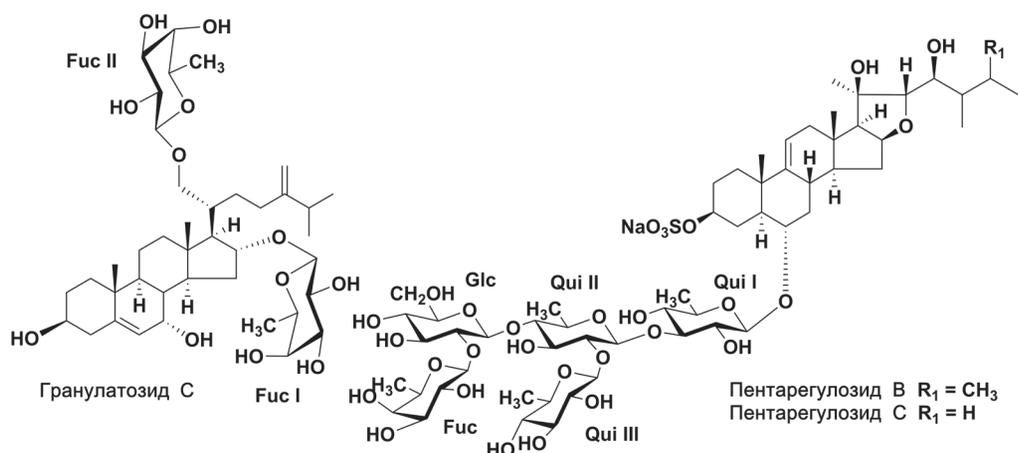


Рис. 5. Структуры гранулатозида С из морской звезды *Choriaster granulatus* и пентарегулозидов В и С из морской звезды *Pentaceraster regulus*

Биологические функции полярных стероидов морских звезд до сих пор недостаточно изучены. Предполагается, что биологическая роль этих метаболитов может быть связана с их распределением в тканях животных. В то же время их биологические функции, безусловно, определяются и проявляемой ими биологической активностью. Нашей группой исследовано распределение полярных стероидов разных классов в различных органах морской звезды *Patiria pectinifera* и выдвинута гипотеза, что полигидроксилированные стероиды морских звезд и родственные им стероидные гликозиды участвуют в пищеварении, подобно стероидным компонентам желчи у позвоночных [10]. Действительно, эти соединения присутствовали только в пищеварительных органах этой морской звезды. Кроме того, они демонстрируют явное структурное сходство со стероидными спиртами и кислотами из желчи рыб и амфибий и имеют эмульгирующие свойства. Недавно нами выделены шесть новых полигидроксилированных стероидных конъюгатов с таурином, микродискусолы А–F из арктической морской звезды *Asterias microdiscus* (рис. 6) [8]. По нашему мнению, выделение новых полигидроксилированных стероидных тауриновых конъюгатов и аналогичных соединений из других видов морских звезд, напоминающих по своей структуре желчные спирты и кислоты позвоночных, является дополнительным аргументом, подтверждающим гипотезу о возможном участии таких полигидроксистероидов в пищеварении морских звезд.

Биосинтез полярных стероидов морских звезд на настоящий момент также малоизучен. Известно всего несколько работ по исследованию биосинтеза агликонов астеросапонинов морских звезд с использованием радиоактивных меченых предшественников.

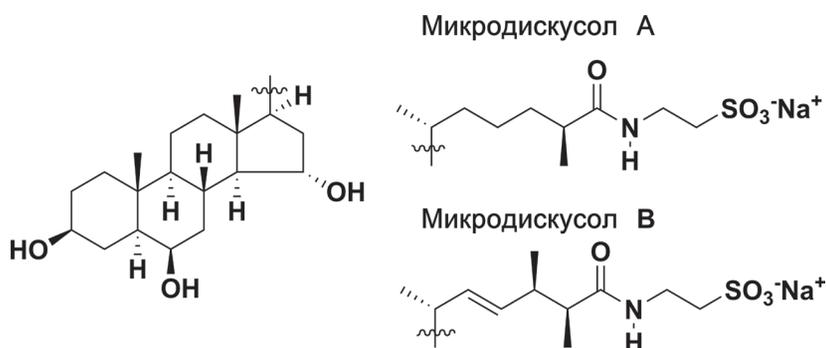


Рис. 6. Структуры микродискусолов А и В из морской звезды *Asterias microdiscus*

Нами впервые изучен биосинтез полигидроксистероидов и родственных им стероидных гликозидов морских звезд с помощью аквариальных экспериментов с мечеными стабильными изотопами холестерина и сульфатом холестерина. Показано, что эти соединения при поступлении с пищей являются биосинтетическими предшественниками полигидроксистероидов и гликозидов полигидроксистероидов. Экспериментально установлено, какие трансформации происходят в циклах А и В стероидного ядра при биосинтезе этих веществ [3].

Таким образом, наши исследования полярных стероидных соединений из морских звезд привели к открытию большой серии новых природных соединений с оригинальным химическим строением и интересными свойствами. Показана перспективность дальнейшего изучения этих метаболитов в качестве канцерпревентивных и иммуномодулирующих средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кича А.А., Калиновский А.И., Левина Э.В., Стоник В.А., Еляков Г.Б. Полигидроксилированные стероиды из пищеварительных органов морской звезды *Patiria pectinifera* // Биоорг. химия. 1983. Т. 9, № 7. С. 975–977.
2. Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. A new steroidal glycoside granuloside C from the starfish *Choraster granulatus*, unexpectedly combining structural features of polar steroids from several different marine invertebrate phyla // Nat. Prod. Commun. 2017. Vol. 12, N 10. P. 1585–1588.
3. Ivanchina N.V., Kicha A.A., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Biosynthesis of polar steroids from the Far Eastern starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera*. Cholesterol and cholesterol sulfate are converted into polyhydroxylated sterols and monoglycoside asterosaponin P₁ in feeding experiments // Steroids. 2013. Vol. 78. P. 1183–1191.
4. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Alkaloidsteroids from the starfish *Lethasterias nanimensis chelifera* // Tetrahedron Lett. 2003. Vol. 44, N 9. P. 1935–1937.
5. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Levina E.V., Stonik V.A., Elyakov G.B. Asterosaponin P₁ from the starfish *Patiria pectinifera* // Tetrahedron Lett. 1983. Vol. 24, N 36. P. 3893–3896.
6. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Malyarenko T.V., Ivanchina N.V., Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., Yurchenko E.A., Pisyagin E.A., Aminin D.L., Huong T.T.T., Long P.Q., Stonik V.A. Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: structures and immunomodulatory activities // J. Nat. Prod. 2015. Vol. 78, N 6. P. 1397–1405.
7. Kicha A.A., Kalinovsky A.I., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Sokolova E.V., Stonik V.A. Furostane series asterosaponins and other unusual steroid oligoglycosides from the tropical starfish *Pentaceraster regulus* // J. Nat. Prod. 2017. Vol. 80, N 10. P. 2761–2770.
8. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Popov R.S., Stonik V.A. Six new polyhydroxylated steroids conjugated with taurine, microdiscusols A–F, from the Arctic starfish *Asterias microdiscus* // Steroids. 2019. Vol. 15. P. 108458.
9. Kicha A.A., Ha D.T., Ivanchina N.V., Malyarenko T.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Hung N.A., Thuy T.T.T., Long P.Q. Six new polyhydroxysteroidal glycosides, anthenosides S1–S6, from the starfish *Anthea sibogae* // Chem. Biodiver. 2018. Vol. 15, N 3. P. e1700553 (1–12).
10. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Gorshkova I.A., Ponomarenko L.P., Likhatskaya G.N., Stonik V.A. The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria* (= *Asterina*) *pectinifera* // Comp. Biochem. Physiol. 2001. Vol. 128B. P. 43–52.
11. Malyarenko T.V., Kharchenko S.D., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Pisyagin E.A., Evtushenko E.V., Antokhina T.I., Minh C.V., Stonik V.A. Anthenosides L–U, steroidal glycosides with unusual structural features from the starfish *Anthea aspera* // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79, N 12. P. 3047–3056.
12. Malyarenko T.V., Malyarenko O.S., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Ermakova S.P., Stonik V.A. *In vitro* anticancer and proapoptotic activities of steroidal glycosides from the starfish *Anthea aspera* // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16, N 11. P. e420.
13. Malyarenko T.V., Ivanchina N.V., Malyarenko O.S., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Minh Ch.V., Kicha A.A. Two new steroidal monoglycosides, anthenosides A1 and A2, and revision of the structure of known anthenoside A with unusual monosaccharide residue from the starfish *Anthea aspera* // Molecules. 2018. Vol. 23. P. e1077.

В.И. КАЛИНИН, С.А. АВИЛОВ, А.С. СИЛЬЧЕНКО

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

Кратко обсуждаются основные достижения в исследовании строения тритерпеновых гликозидов голотурий в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН с 1968 г. по настоящее время.

Ключевые слова: голотурии, тритерпеновые гликозиды.

Structural studies on sea cucumber triterpene glycosides in G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the FEB RAS. V.I. KALININ, S.A. AVILOV, A.S. SIL'CHENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The article briefly discusses main achievements in the investigation of structures of sea cucumber triterpene glycosides in G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS from 1968 till nowadays.

Kew words: sea cucumbers, triterpene glycosides.

В конце 1960-х годов, когда по предложению В.Е. Васьяковского в Институте биологически активных веществ ДВФ СО АН СССР (с 1972 г. Тихоокеанский институт биоорганической химии) стали развивать морскую тематику, было решено начать исследования «морских» метаболитов – представителей тех классов природных соединений, опыт изучения «растительных» аналогов которых уже имелся. Первыми в области тритерпеновых гликозидов голотурий были работы Г.Б. Елякова, Т.А. Кузнецовой и В.Е. Васьяковского (1968 г.) о составе гликозидной фракции *Apostichopus japonicus* [7], а также Г.Б. Елякова и Н.В. Перетолчина (1970 г.) – о гликозидах *Eupentacta fraudatrix* [5]. Этот этап завершился публикацией данных о структуре агликона гликозида из *A. japonicus*, которая впоследствии была пересмотрена [23].

В 1973–1975 гг. вышли работы Г.Б. Елякова, В.А. Стоника и др., посвященные сравнительному изучению гликозидных фракций 43 видов голотурий, собранных в самых разных районах Тихого и Атлантического океанов, что позволило сделать выводы о таксономической специфичности основных компонентов гликозидных фракций для различных родов и групп родов голотурий, не утратившие своего значения до сих пор [24, 25].

С конца 1970-х годов началось широкое применение спектроскопии ЯМР ¹³C и использование хромато-масс-спектрометрических подходов к анализу продуктов метилирования

*КАЛИНИН Владимир Иванович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, АВИЛОВ Сергей Анатольевич – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, СИЛЬЧЕНКО Александра Сергеевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: kalininv@piboc.dvo.ru

гликозидов. В результате этих исследований в лаборатории В.А. Стоника трудами В.Ф. Шарыпова, Н.И. Калиновской, Ш.Ш. Афиятуллова, А.И. Калиновского и др. было установлено строение нативных агликонов гликозидов из представителей родов *Stichopus*, *Astichopus* и *Thelenota*, а также из *Eupentacta fraudatrix* и *Cucumaria japonica*. Ряд нативных генинов удалось получить с использованием различных методов мягкой химической или ферментативной деградации углеводных цепей [6, 8, 14, 17] (рис. 1).

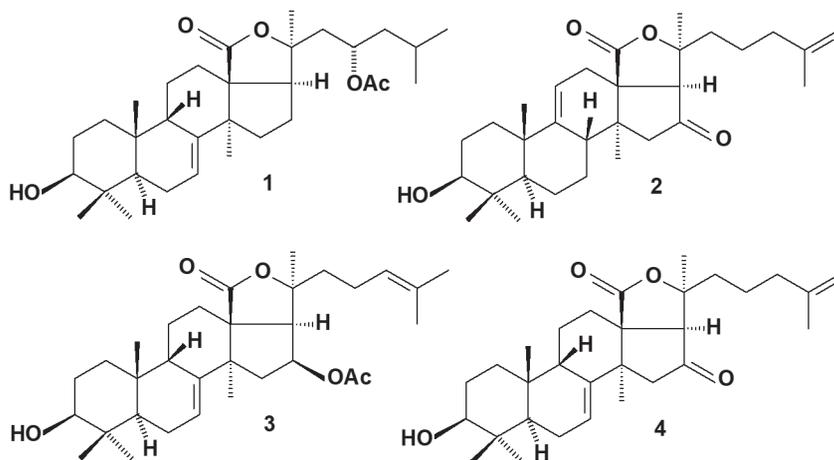


Рис. 1. Нативные агликоны гликозидов голотурий: 1 – агликон гликозидов из *Stichopus chloronotus*, 2 – голотоксиногенин – агликон гликозидов из *Apostichopus japonicus*, 3 – агликон гликозидов *Eupentacta fraudatrix*, 4 – агликон гликозидов *Cucumaria japonica*

Были изучены химические трансформации нативных агликонов с 7(8)-двойной связью при кислотном гидролизе и обнаружена миграция двойной связи из положения 7(8) в положение 8(9) и далее 9(11) (рис. 2). Установлено, что в агликонах гликозидов из голотурий семейства Holothuriidae, имеющих 9(11)-двойную связь и 12 α -гидроксил, в условиях гидролиза происходит дегидратация с образованием 8(9), 11(12)-диена (гомоанулярный диен), который превращается в гетероанулярный 7(8), 9(11)-диен (рис. 3). К сожалению, это исследование, выполненное Л.Я. Коротких, так и осталось неопубликованным, а позже аналогичный диен был независимо обнаружен японскими химиками [29].

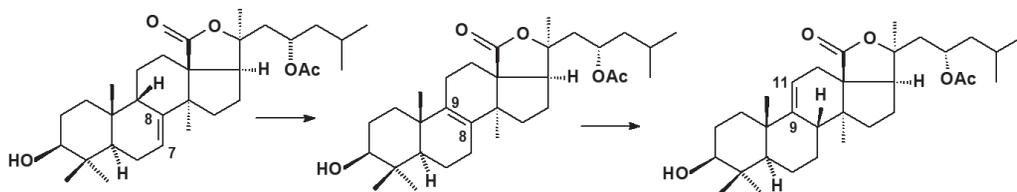


Рис. 2. Миграция 7(8)-двойной связи в положение 8(9) и далее в положение 9(11) в аглиционе гликозидов *S. chloronotus*

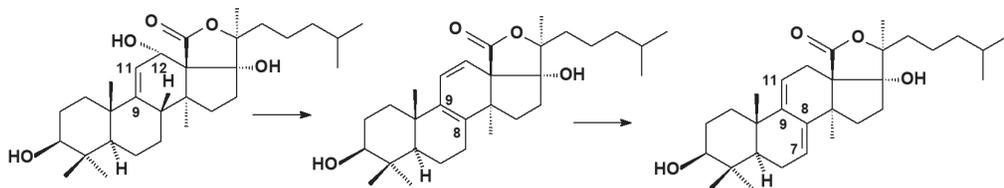


Рис. 3. Дегидратация агликона гликозидов *Holothuria mexicana* с образованием гомоаннулярного 8(9),11(12)-диена с последующей миграцией двойных связей

Для агликонов гликозидов *E. fraudatrix* в условиях щелочной обработки и при восстановлении 16-кето-группы в агликоне гликозидов *C. japonica* была обнаружена перерециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон [9, 18] (рис. 4, 5).

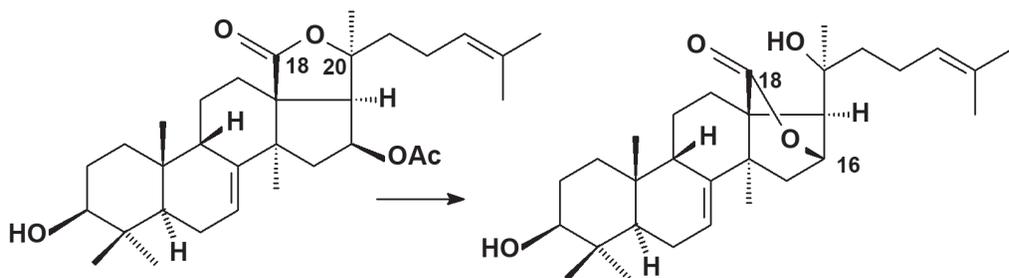


Рис. 4. Перециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон при щелочной обработке агликона из *E. fraudatrix*

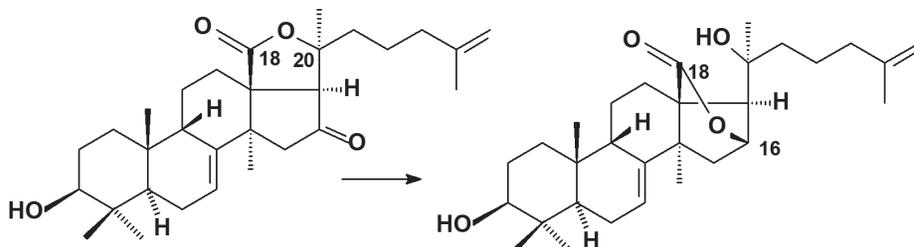


Рис. 5. Перециклизация 18(20)-лактона в 18(16)-лактон при восстановлении 16-кетогруппы в агликоне гликозидов *C. japonica*

Применение И.И. Мальцевым, В.А. Стоником и др. различных ферментативных и химических методов деградации углеводных цепей, включая периодатное окисление (деградация по Смиту) в сочетании со спектроскопией ЯМР ^{13}C , позволило установить основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий семейств Stichopodidae, включая разветвленные по первому остатку ксилозы гексаозиды, а также биоизиды и тетраозиды, являющиеся промежуточными продуктами биосинтеза [15, 16] (рис. 6).

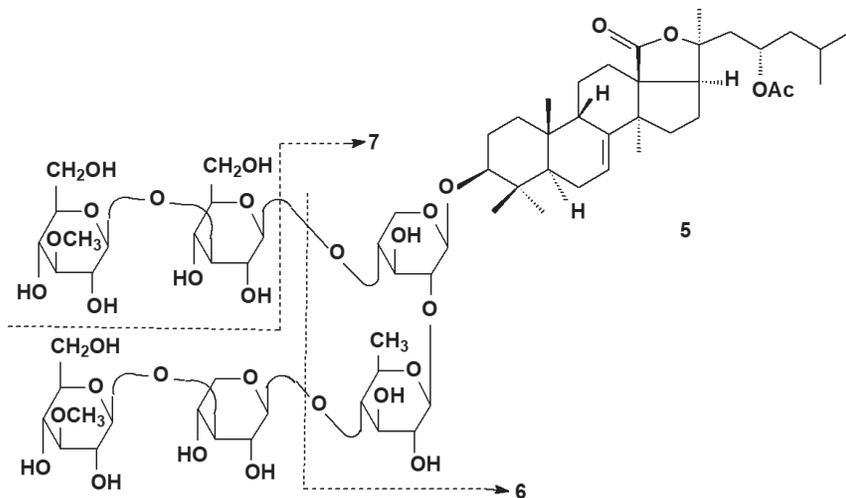


Рис. 6. Основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий сем. Stichopodidae. 5 – стихопозид С из *S. chloronotus*, 6 – стихопозид А из *S. chloronotus*, 7 – теленотозид А из *Thelenota ananas*

Аналогичная работа была выполнена для углеводных цепей голотурий семейства Holothuriidae, где основными типами углеводных цепей оказались сульфатированные по С-4 первого ксилозного остатка биозида и тетраозида [10], а также гексаозида [2] (рис. 7). Подобный сульфатированный тетраозид с терминальным остатком 3-О-метилксилозы был найден Ш.Ш. Афиятулловым и др. в *Eupentacta fraudatrix* [4]. Кроме того, С.А. Авиловым и др. в гликозидах *C. japonica* были найдены пентаозида, разветвленные по С-2 второго моносахаридного остатка [1] (рис. 8). Аналогичные гликозиды были найдены Ш.Ш. Афиятулловым и др. в *E. fraudatrix* [3].

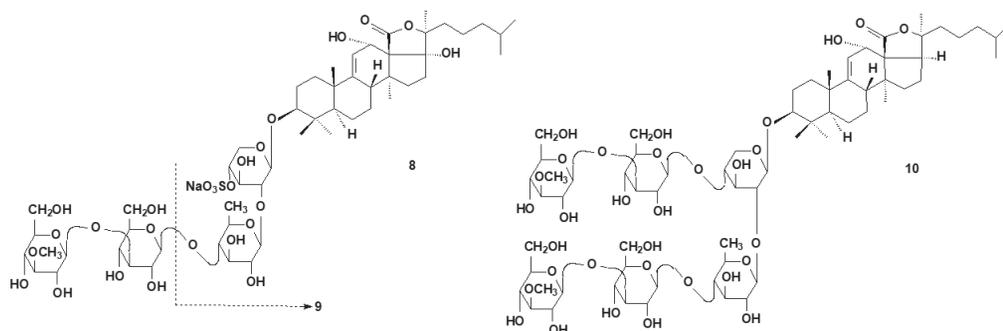


Рис. 7. Основные типы углеводных цепей гликозидов голотурий семейства Holothuriidae. 8 – голотурин А, 9 – голотурин В из *Holothuria* spp., 10 – бивиттозид D из *Bohadschia* spp.

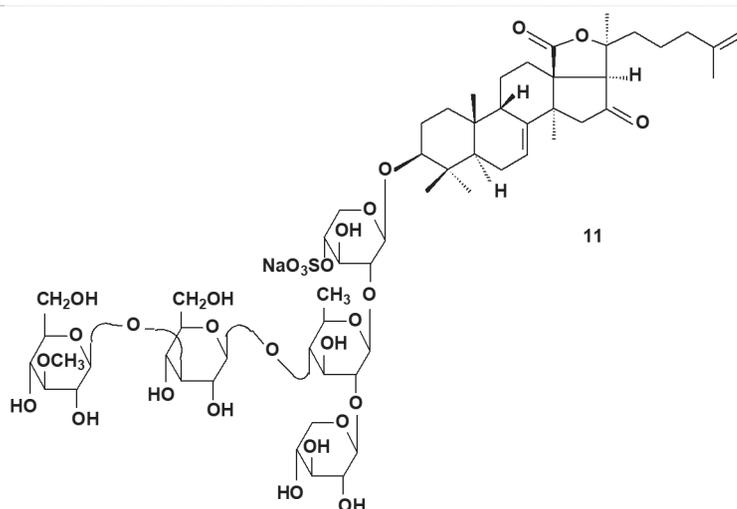


Рис. 8. Кукумариозид А₂-2 (11) из голотурии *Cicumaria japonica*

С начала 1980-х годов центр тяжести в исследованиях сместился с представителей отряда Aspidochirotida на представителей отряда Dendrochirotida, который был менее изучен, а его гликозиды отличались большим структурным разнообразием. Поскольку голотурии этого отряда обитают преимущественно в холодных водах, то сбор животного материала производили главным образом в северной части Тихого океана драгированием. Кроме того, начали изучать и малодоступных тропических представителей этого отряда. Расширение круга объектов исследования привело к обнаружению новых типов агликонов, так называемых неголостановых производных, т.е. не содержащих лактона или имеющих 18(16)-лактон вместо 18(20)-лактона [27] (рис. 9).

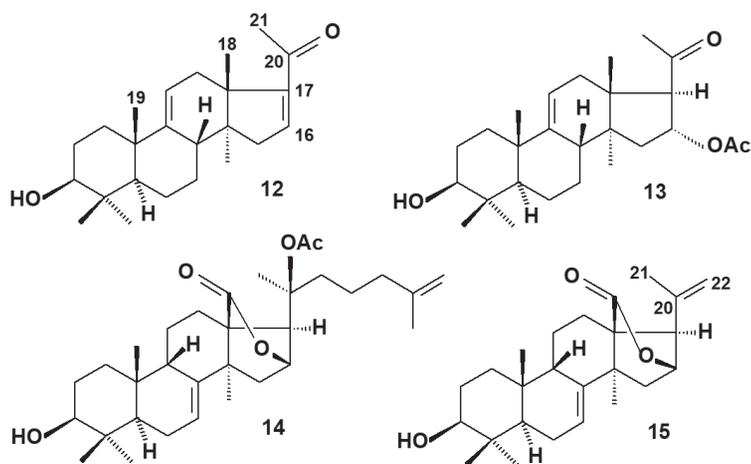


Рис. 9. Примеры негостановых агликонов. 12 – курилогенин (артефактный агликон), 13 – нативный агликон гликозидов из *Duasmodactyla kurilensis*, 14 – онекотаногенин гликозидов из *Psolus fabricii*, 15 – агликон гликозидов из *E. fraudatrix*

Удалось обнаружить углеводные цепи, сульфатированные по С-6 остатков глюкозы и 3-О-метилглюкозы (рис. 10), а также другим положениям, отличным от С-4 первого ксилозного остатка [12, 34].

К концу 1990-х годов накопленные данные о структурах, таксономическом распределении и цитотоксической активности гликозидов позволили установить, что в разных отрядах голотурий эволюция гликозидов проходит параллельно и независимо как в агликонах, так и в углеводных цепях [11], причем в ее ходе наблюдается увеличение цитотоксической активности и растворимости, а также выигрыш в метаболической цене. Это ведет к формированию мозаичного разнообразия структур, которые образуют в отдельных видах целые комбинаторные библиотеки. Был сформулирован ряд закономерностей эволюции гликозидов, аналогичных морфологическим закономерностям эволюции [26, 28].

Широкое внедрение в практику исследований высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления, методов двумерной спектрометрии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения вывело исследования тритерпеновых гликозидов

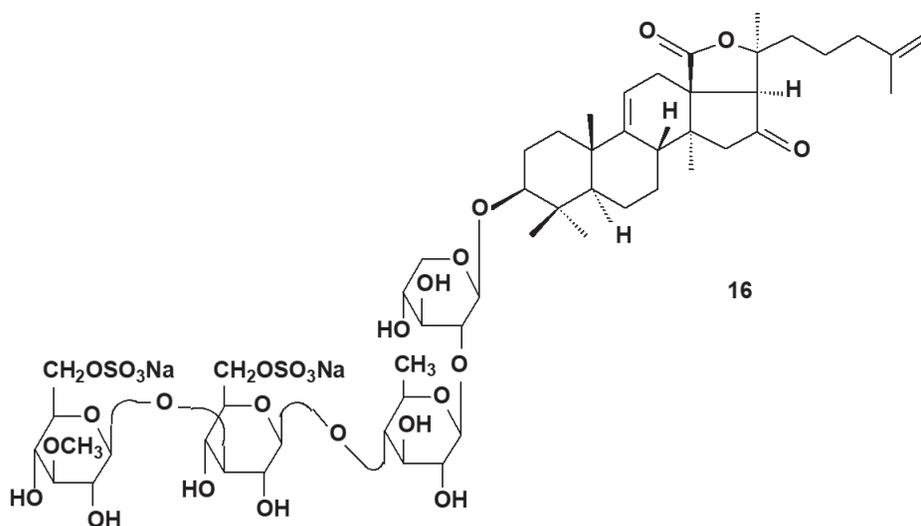


Рис. 10. Псолюлозид А (16) из *Psolus fabricii*

голотурий на новый уровень. Получение данных о многих десятках структур гликозидов позволило определить характер биосинтеза углеводных цепей как мозаичный (образующий метаболическую сеть), происходящий путем удлинения на один моносахаридный остаток с последующей независимой модификацией (сульфатирование, метилирование терминальных моносахаридных остатков и т.д.) [31]. Были обнаружены новые моносахаридные остатки – 3-О-метилглюкуроновая кислота и 3-О-метилхинозона [21, 19]. Путем анализа структур минорных неголостановых гликозидов удалось уточнить начальные стадии биосинтеза гликозидов голотурий [35]. Были обнаружены новые варианты окисления неголостановых агликонов, а также два агликона с новыми карбоциклическими системами, образовавшимися путем внутримолекулярной альдольной конденсации и перегруппировки Майнвальда [27, 32] (рис. 11).

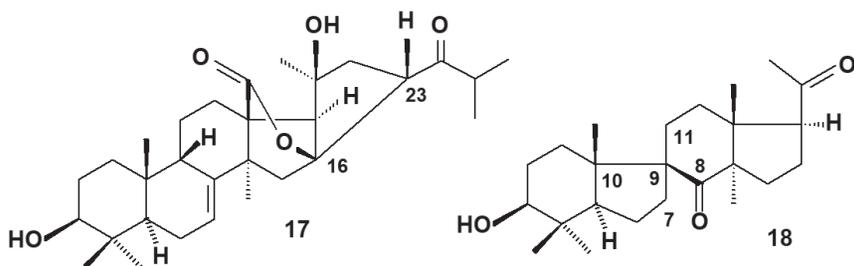


Рис. 11. Агликоны с новыми типами карбоциклических систем из гликозидов *Cucumaria fallax*. 17 – агликон с дополнительным циклом, полученным при внутримолекулярной альдольной конденсации 1,6-дикетонного предшественника; 18 – агликон с кольцом В, уменьшенным до пятичленного в результате внутримолекулярной перегруппировки Майнвальда из 8,9-эпоксидного предшественника

Тритерпеновые гликозиды использовались также в хемосистематике голотурий. Так, в продолжение классических работ [24, 25], данные которых были подтверждены на уровне полных структур основных компонентов гликозидных фракций, выделены два новых рода голотурий, а именно *Pearsonothuria* для *Bohadschia graeffei* [13] и *Australostichopus* для *Stichopus mollis* [30], а также подтверждено выделение из *Cucumaria japonica* ряда новых видов и отнесение их к роду *Cucumaria* [22]. Впервые были исследованы представители глубоководной фауны голотурий, а именно представители отряда Elaspodida, собранные в Антарктике [20] и в Арктике [33], относящиеся к семейству Elpidiidae. На основе сходства их тритерпеновых гликозидов подтверждено единство происхождения семейства и пути распространения его представителей по глубоководным желобам (рис. 12).

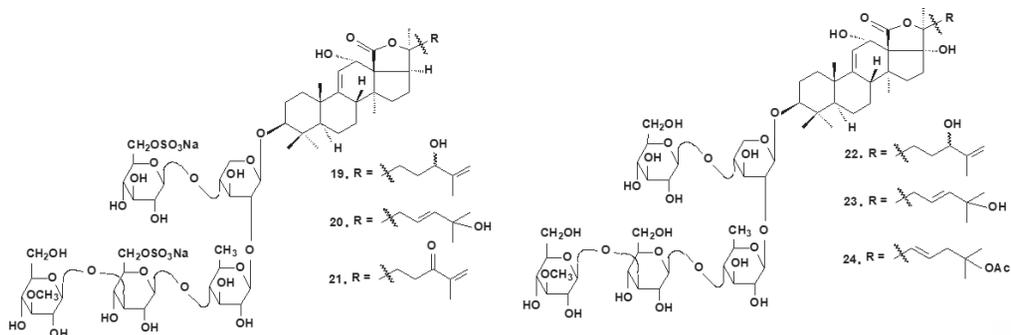


Рис. 12. Ахлионицеозиды А₁–А₃ (19–21) из антарктической голотурии *Achlionice violaeacuspidata* (= *Rhipidothuria racowitzai*); кольгаозиды А (22) и В (23), а также голотуринозид В (24) из глубоководной арктической голотурии *Kolga hyalina*

Таким образом, за время исследования гликозидов голотурий в ТИБОХ ДВО РАН, инициированных Г.Б. Еляковым и В.Е. Васьковским и выполненных под руководством В.А. Стоника, получен огромный массив данных о структурном разнообразии, биосинтезе, таксономическом распределении и эволюции этих веществ. Всего было открыто более 250 новых природных соединений этого химического класса. Таким образом, была создана добротная структурная база для выполнения глубоких исследований по биологической активности этих веществ, весьма впечатляющие результаты и перспективы которых не затрагиваются в этой статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авиллов С.А., Стоник В.А., Калиновский А.И. Структура четырех новых тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соедин. 1990. № 6. С. 787–792.
2. Антонов А.С., Стоник В.А. Гликозиды голотурий рода *Bohadschia* // Химия природ. соедин. 1986. № 3. С. 379–380.
3. Афиятуллово Ш.Ш., Калиновский А.И., Стоник В.А. Структура кукумариозидов C_1 и C_2 – двух новых тритерпеновых гликозидов из голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1987. № 6. С. 831–837.
4. Афиятуллово Ш.Ш., Тищенко Л.Я., Стоник В.А., Калиновский А.И., Еляков Г.Б. Структура кукумариозидов G_1 – нового тритерпенового гликозида из голотурии *Cucumaria fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1985. № 2. С. 244–248.
5. Еляков Г.Б., Перетолчин Н.В. Кукумариозид С – новый тритерпеновый гликозид из голотурии *Cucumaria fraudatrix* // Химия природ. соедин. 1970. № 5. С. 637–638.
6. Еляков Г.Б., Стоник В.А., Афиятуллово Ш.Ш., Калиновский А.И., Шарыпов В.Ф., Коротких Л.Я. Нативные генины из гликозидов голотурий // Докл. АН СССР. 1981. Т. 259, № 6. С. 1367–1369.
7. Еляков Г.Б., Кузнецова Т.А., Васьковский В.Е. О составе гликозидной фракции из *Stichopus japonicus* // Химия природ. соедин. 1968. № 4. С. 253–254.
8. Иванова Н.С., Сметанина О.Ф., Кузнецова Т.А. Гликозиды морских беспозвоночных. XXVI. Голотурии А из тихоокеанской голотурии *Holothuria squamifera*. Выделение нативного агликона // Химия природ. соедин. 1984. № 4. С. 448–451.
9. Ильин С.Г., Решетняк М.В., Афиятуллово Ш.Ш., Стоник В.А., Еляков Г.Б. Кристаллическая и молекулярная структура диацетата голоста-8(9)-ен-3 α ,16 β -диола // Докл. АН СССР. 1985. Т. 284, № 2. С. 356–359.
10. Калинин В.И., Стоник В.А. Гликозиды морских беспозвоночных. Структура голотурина A_2 из голотурии *Holothuria edulis* // Химия природ. соедин. 1982. № 2. С. 215–219.
11. Калинин В.И., Стоник В.А., Авиллов С.А. Гомологическая изменчивость и направленность в эволюции тритерпеновых гликозидов голотурий (Holothurioidea, Echinodermata) // Журн. общ. биологии. 1990. Т. 51, № 2. С. 247–260.
12. Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А. Структура псолосозида А – основного тритерпенового гликозида из голотурии *Psolus fabricii* // Химия природ. соедин. 1985. № 2. С. 212–217.
13. Левин В.С., Калинин В.И., Стоник В.А. Опыт использования химических признаков при пересмотре таксономического статуса голотурии *Bohadschia graeffei* с выделением нового рода // Биол. моря. 1984. № 3. С. 33–38.
14. Олейникова Г.К., Кузнецова Т.А. Двухступенчатая деградация по Смитцу голотурина V_1 из голотурии *Holothuria floridana* // Химия природ. соедин. 1983. № 4. С. 534–536.
15. Стоник В.А., Мальцев И.И., Калиновский А.И., Кондэ К., Еляков Г.Б. Гликозиды морских беспозвоночных. XI. Два новых тритерпеновых гликозида из голотурий семейства Stichopodidae // Химия природ. соедин. 1982. № 2. С. 194–199.
16. Стоник В.А., Мальцев И.И., Еляков Г.Б. Структура теленотозидов А и В из голотурии *Thelenota ananas* // Химия природ. соедин. 1982. № 5. С. 624–627.
17. Шарыпов В.Ф., Калиновская Н.И., Стоник В.А. Выделение голоста-9(11),25(26)-диен-3 β -ол-16-она – нативного генина из гликозидов голотурии *Stichopus japonicus* // Химия природ. соедин. 1980. № 6. С. 845–846.
18. Шарыпов В.Ф., Калиновский А.И., Стоник В.А., Авиллов С.А., Еляков Г.Б. Выделение нативных агликонов из тритерпеновых гликозидов тихоокеанской голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соедин. 1985. № 1. С. 55–59.
19. Antonov A.S., Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Anastuyk S.D., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Kalinin V.I., Smirnov A.V., Taboada S., Ballesteros M., Avila C., Stonik V.A. Triterpene glycosides from Antarctic sea cucumbers I. Structure of liouvillosides A_1 , A_2 , A_3 , B_1 and B_2 from the sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*, new procedure for separation of highly polar glycoside fractions and taxonomic revision // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71. P. 1677–1685.
20. Antonov A.S., Avilov S.A., Kalinovsky A.I., Anastuyk S.D., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Taboada S., Bosh A., Avila C., Stonik V.A. Triterpene glycoasides from Antarctic sea cucumbers. 2. Structure of achlioniceosides A_1 , A_2 and A_3 from the sea cucumber *Achlionice violaescupidata* (= *Rhipidothuria racowitzai*) // J. Nat. Prod. 2009. Vol. 72. P. 33–38.

21. Avilov S.A., Silchenko A.S., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Smirnov A.V., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Fedorov S.N., Savina A.S., Shubina L.K., Stonik V.A. Synaptosides A and A₁, Two triterpene glycosides from the sea cucumber *Synapta maculata* containing 3-O-methylglucuronic acid and their cytotoxic activity against tumor cells // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71, N 4. P. 525–531.
22. Avilov S.A., Kalinin V.I., Smirnov A.V. Use of triterpene glycosides for resolving taxonomic problems in the sea cucumber genus *Cucumaria* (Holothurioidea, Echinodermata) // Biochem. System. Ecol. 2004. Vol. 32. P. 715–733.
23. Elyakov G.B., Kuznetsova T.A., Dzizenko A.K., Elkin Yu.N. A chemical investigation of the trepang (*Stichopus japonicus* Selenka): the structure of terpenoid aglycones obtained from trepang glycosides // Tetrahedron Lett. 1969. N 15. P. 1151–1154.
24. Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V., Slanke V.P., Kuznetsova T.A., Levin V.S. Glycosides of marine invertebrates-I. A Comparative study of glycoside fraction of Pacific sea cucumbers // Comp. Biochem. Physiol. 1973. Vol. 44B. P. 325–336.
25. Elyakov G.B., Kuznetsova T.A., Stonik V.A., Levin V.S., Albores R. Glycosides of marine invertebrates-IV. A Comparative study of the glycosides from Cuban sublittoral holothurians // Comp. Biochem. Physiol. 1975. Vol. 52B. P. 413–417.
26. Kalinin V.I., Stonik V.A. Application of morphological trends of evolution to phylogenetic interpretation of chemotaxonomic data // J. Theor. Biol. 1996. Vol. 180. P. 1–10.
27. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. Non-holostane aglycones of sea cucumber triterpene glycosides. Structure, biosynthesis, evolution // Steroids. 2019. Vol. 147. P. 43–51.
28. Kalinin V.I. System-theoretical (holistic) approach to the modelling of structural-functional relationships of Biomolecules and their evolution: an example of triterpene glycosides from sea cucumbers (Echinodermata, Holothurioidea) // J. Theor. Biol. 2000. Vol. 206. P. 151–168.
29. Kitagawa I., Kobayashi M., Hori M., Kyogoku Y. Studies of four new triterpenoidal oligoglycosides, bivittosides A, B, C, and D, from the sea cucumber *Bohadschia bivittata* Mitsukuri // Chem. Pharm. Bull. 1981. Vol. 29, N 1. P. 282–285.
30. Moraes G., Northcote P.T., Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Levin V.S. Structure of major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus* // Biochem. System. Ecol. 2004. Vol. 32. P. 637–650.
31. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Ermakova S.P., Malyarenko O.S., Dolmatov I.Y., Kalinin V.I. Cladolosides O, P, P₁–P₃ and R, triterpene glycosides with two novel types of carbohydrate chains from the sea cucumber *Cladolabes schmeltzii*. Inhibition of cancer cells colony formation and its synergy with radioactive irradiation // Carbohydrate Res. 2018. Vol. 468. P. 73–79.
32. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Berdyshev D.V., Chingizova E.A., Andryjaschenko P.V., Minin K.V., Stonik V.A. Fallaxosides B₁ and D₃, triterpene glycosides with novel skeleton types of aglycones from the sea cucumber *Cucumaria fallax* // Tetrahedron. 2017. Vol. 73. P. 2335–2341.
33. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Fedorov S.N., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Kalinin V.I., Rogacheva A.V., Gebruk A.V. Kolgaosides A and B, two new triterpene glycosides from the Arctic deep water sea cucumber *Kolga hyalina* (Elasipodida: Elpidiidae) // Nat. Prod. Commun. 2014. Vol. 9, N 9. P. 1259–1264.
34. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Smirnov A.V. Pseudostichoposide B – new triterpene glycoside with unprecedented type of sulfatation from deep-water North-Pacific sea cucumber *Pseudostichopus trachus* // Nat. Prod. Res. 2004. Vol. 18, N 6. P. 565–570.
35. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Kalinin V.I., Stonik V.A. 3β-O-Glycosylated 16β-acetoxy-9β-H-lanosta-7,24-diene-3β,18,20β-triol, an intermediate metabolite from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* and its biosynthetic significance // Biochem. System. Ecol. 2012. Vol. 44. P. 53–60.

Т.Н. МАКАРЬЕВА, А.Г. ГУЗИЙ, Л.К. ШУБИНА, Е.Г. ЛЯХОВА,
С.А. КОЛЕСНИКОВА, К.М. ТАБАКМАХЕР,
Е.К. КУДРЯШОВА, В.А. СТОНИК

Поиск и структурное изучение новых биоактивных вторичных метаболитов из морских беспозвоночных

В течение 2015–2019 гг. лабораторией химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН были продолжены поиск, выделение, структурные исследования и определение биологической активности новых вторичных метаболитов из тропических и бореальных морских беспозвоночных. Основными источниками этих соединений стали губки, гидроиды, а также полихеты. Обнаружены первые члены структурных типов алкалоидов, пиридиновых нуклеозидов и липидов. Разработаны новые подходы к решению некоторых структурных задач. Определены различные виды активности найденных веществ.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, азаиндолы, алкалоиды, пиридиновые нуклеозиды, липиды, морские губки, гидроиды, полихеты.

Search and structural study of new bioactive secondary metabolites from marine invertebrates.
T.N. MAKARIEVA, A.G. GUZII, L.K. SHUBINA, E.G. LYAKHOVA, S.A. KOLESNIKOVA, K.M. TABAKMAKHER,
E.K. KUDRYASHOVA, V.A. STONIK (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The search, isolation, structural studies and determination of the biological activity of new secondary metabolites from tropical and boreal marine invertebrates were carried out in the laboratory of chemistry of sea natural compounds of the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, during the period 2015–2019. It was found that the dominant biological sources of these compounds were sponges, hydroids, and polychaetes. The first members of the structural types of alkaloids, pyridine nucleosides and lipids were discovered. New approaches in solving some structural problems were developed. Various types of activity for new substances were found.

Key words: secondary metabolites, azaindoles, alkaloids, pyridine nucleosides, lipids, marine sponges, hydroids, polychaetes.

Беспозвоночные – многоклеточные относительно примитивные организмы в основном древнего происхождения, особенно разнообразны в морской среде: число исключительно морских типов и классов беспозвоночных в два раза больше, чем наземных. Известны 34 типа морских беспозвоночных, в том числе Porifera (губки), Cnidaria (кишечнополостные), Polychaeta (многощетинковые черви), Mollusca (моллюски), Nemichordata

*МАКАРЬЕВА Татьяна Николаевна – доктор химических наук, главный научный сотрудник, ГУЗИЙ Алла Григорьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ШУБИНА Лариса Кимовна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ЛЯХОВА Екатерина Геннадьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, КОЛЕСНИКОВА Софья Александровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ТАБАКМАХЕР Ксения Михайловна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории, КУДРЯШОВА Екатерина Константиновна – младший научный сотрудник, СТОНИК Валентин Аронович – доктор химических наук, академик, научный руководитель института (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: makarieva@piboc.dvo.ru

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00034.

(полухордовые) и др. Эти преимущественно бентосные организмы тропических и бореальных вод играют важную роль в морских экосистемах. Древнее происхождение, особые условия обитания, наличие симбионтных микроорганизмов и экстремальное таксономическое разнообразие во многом определяют то, что морские беспозвоночные являются наиболее богатым и перспективным источником вторичных метаболитов с необычными химическими структурами и часто беспрецедентными биологическими активностями. Такие вещества обладают огромным биомедицинским потенциалом, поскольку проявляют противоопухолевые, противовирусные, противовоспалительные, антимикотические, противобактериальные и другие свойства.

Исследования лаборатории химии морских природных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии (ТИБОХ) в течение 40 лет были сосредоточены на поиске, выделении и определении структуры новых вторичных метаболитов из разных типов морских беспозвоночных. Сбор и поиск их биологических источников был осуществлен во время научных рейсов на НИС «Профессор Богоров» и «Академик Опарин» в тропические зоны Индийского океана и в северные и тропические зоны Тихого океана (см. таблицу). Всего было изучено 7489 различных образцов морских беспозвоночных. Во время этих экспедиций были приготовлены этанольные экстракты, из сухих проб – водные растворы с концентрацией 4 мг/мл, определена биоактивность с применением различных методов тестирования (до 14 тестов), включая ингибирование различных ферментов, цитотоксическую, антимикробную и др. Анализ полученных данных в сочетании с данными тонкослойной хроматографии (ТСХ) и сведениями о таксономической принадлежности собранных образцов давал возможность выбора перспективных источников для выделения новых биоактивных вторичных метаболитов. В таблицу не включены данные о представителях типа Echinodermata (иглокожие), в том числе голотуриях, морских звездах и морских ежах, так как до наших поисков эти морские беспозвоночные уже были хорошо известны в качестве перспективных источников биоактивных вторичных метаболитов – тритерпеновых гликозидов, различных производных полигидроксистероидов и полигидроксинафтахинонов. Их изучают другие группы сотрудников нашего института.

Огромное значение имело наличие достаточного для последующих химических исследований количества того или иного образца (от 100 г и более). Таких образцов, как правило, было не более 20 % от общего числа. Тем не менее изучение высокоактивных образцов, полученных в меньших количествах, также было перспективным. Так, после обнаружения высокой активности в образце колониальной асцидии в 13-м рейсе НИС «Академик Опарин» у побережья Приморья, этот объект удалось заготовить в количествах, достаточных для химических исследований, в этом же рейсе. В итоге выделили и установили структуры новых высокоактивных полисульфидов из этой асцидии [11]. Во время 17-го рейса НИС «Академик Опарин» была найдена одиночная асцидия, экстракт которой обладал цитотоксической активностью и давал необычное синее пятно при ТСХ анализе. Этот объект заготовили в последующем рейсе, и из его экстрактов удалось выделить и установить структуру первого эрголинового алкалоида морского происхождения [10], который был назван в связи с 40-летним юбилеем ТИБОХ пибоцином (от PIVOC – аббревиатуры названия нашего института на английском языке Pacific Institute of Bioorganic Chemistry).

Поиск новых биологических источников биоактивных вторичных метаболитов среди морских беспозвоночных в большей степени был связан с тестированием их экстрактов на различные активности. Как показал накопленный опыт, их проявляет лишь небольшая часть экстрактов, для тропических представителей это чуть более 20 %, а для беспозвоночных из умеренных и холодных вод – менее 20 %. Тем не менее в результате многолетних исследований были найдены беспрецедентные источники новых алкалоидов, необычных липидов, пиридиновых нуклеозидов и т.д.

Приведем примеры некоторых интересных исследований, выполненных нами за период с 2015 по 2019 г. Так, из 378 изученных экстрактов в 47-м рейсе НИС «Академик

**Районы сбора материала и время проведения научных рейсов НИС «Профессор Богоров»
и «Академик Опарин»**

Рейс, №	Месяц, год	Места сбора	Количество образцов
Рейсы НИС «Профессор Богоров» в Индийский океан			
12	Декабрь, 1981 – март, 1982	Сейшельские острова, о-в Мадагаскар, восточное побережье Африки, о-в Сокотра	410
17	Декабрь, 1983 – май, 1984	Сейшельские острова, банка Сая-де-Малья, о-в Мадагаскар, Танзания, о-в Маврикий	278
20	Июнь–июль, 1985	Мозамбик, Эфиопия, о-в Мадагаскар, Сейшельские острова	329
Рейсы НИС «Академик Опарин» в северо-западную часть Тихого океана			
2	Август, 1986	Центральная и северная часть Курильских островов, банка Кашеверова	259
7	Июнь–июль, 1988	Охотское море, Курильские острова	143
13	Май–июнь, 1991	Бухта Троица, побережье Приморья	49
17	Май–июнь, 1993	Побережье Приморья, о-в Сахалин, Командорские острова	201
18	Сентябрь, 1995	Побережье Приморья	264
23	Июль, 1999	Курильские острова	187
29	Июль, 2003	О-в Сахалин, Курильские острова	326
31	Июль, 2005	-«-	164
36	Июль–август, 2008	-«-	296
41	Июль, 2011	-«-	450
43	Июль–август, 2012	-«-	619
47	Июль–август, 2015	Курильские острова, о-в Беринга	378
48	Август–октябрь, 2016	-«-	103
50	Май–июнь, 2017	Курильские острова	387
Рейсы НИС «Академик Опарин» в южную часть Тихого океана			
3	Сентябрь, 1986 – январь, 1987	Сейшельские о-ва, Амирантские о-ва, Танзания, о-ва Каргадос-Карахос	355
7	Июль–ноябрь, 1988	Большой Барьерный риф (Австралия), о-ва Кука, Новые Гебриды	210
13	Апрель–июнь, 1991	Филиппинское море	264
30	Декабрь, 2004 – январь, 2005	Вьетнам	287
34	Май–июнь, 2007	-«-	234
38	Апрель–май, 2010	-«-	338
45	Апрель–июнь, 2013	-«-	417
49	Декабрь, 2016 – январь, 2017	-«-	323
50V	Июнь–август, 2018	-«-	218
Всего			7489

Опарин» только один экстракт губки *Guitarra fimbriata*, собранной у Курильских островов, показал высокие ингибирующие свойства по отношению к рекомбинантной щелочной фосфатазе из морской бактерии *Cobetia marina* (CmAP). Были подобраны методы выделения метаболитов из экстрактов этой губки, используя данную активность. С помощью анализа ЯМР и масс-спектрометрических (МС) данных высокого разрешения было найдено, что выделенные соединения, названные нами гитарринами А–Е (1–5), являются производными индола с дополнительным атомом азота, включенным в его шестичленный цикл (рис. 1) [3]. Одно из них (1а) оказалось беспрецедентным комплексным соединением, состоящим из трех молекул азаиндола **1**, связанных с атомом алюминия. Точное положение дополнительного азота в индоле при С-5 было определено только с помощью рентгеноструктурного анализа монокристаллов веществ **1** и **1а** (рис. 2), так как

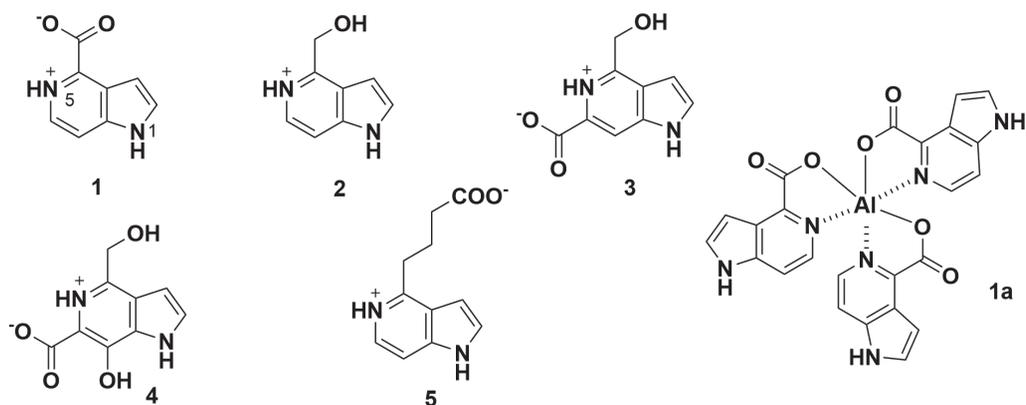


Рис. 1. Структуры первых природных 5-азаиндолов

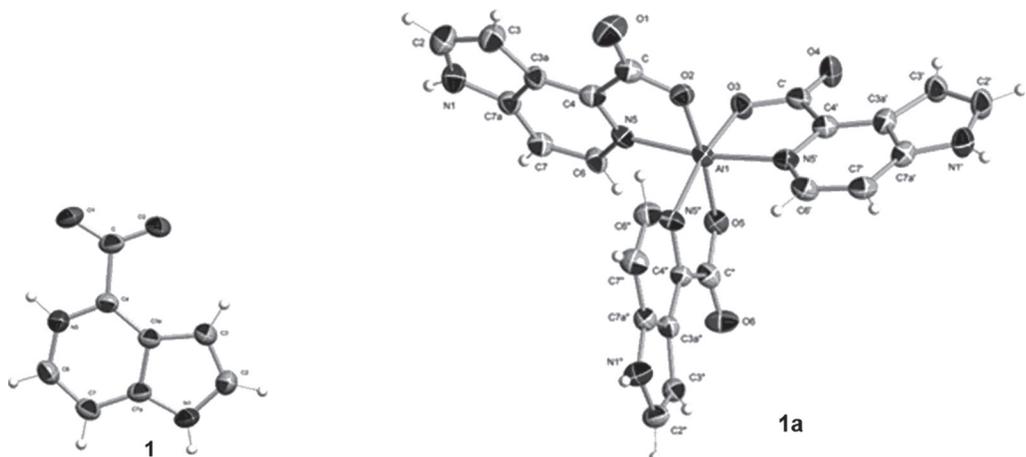


Рис. 2. Рентгеновские структуры 5-азаиндолов 1 и 1a

изучение с помощью ЯМР-экспериментов не позволило получить эту информацию из-за неклассических эффектов гетероядерного взаимодействия, свойственных таким низкомолекулярным ароматическим соединениям [3].

Обнаружено, что среди выделенных азаиндолов только соединение **3** в очень низких концентрациях подавляет активность *SmAP*. Так, оно ингибировало эту активность при $IC_{50} = 2,0$ мкМ, в то время как этилендиаминтетрацетат, наиболее сильный из известных ингибиторов этого фермента, имел $IC_{50} = 80\ 000$ мкМ. Мы надеемся, что найденный новый мощный ингибитор фосфатазы *SmAP* будет способен регулировать активность и аналогичных фосфатаз, т.е. иметь медицинское значение [3].

Экстракты из морской губки *Lissodendoryx florida*, собранной во время того же 47-го рейса, были выбраны нами для дальнейшего изучения из-за наличия необычных желтых пятен при ТСХ-анализе. В результате были выделены два метаболита, названные лиссодендориковыми кислотами А (**6**) и В (**7**) (рис. 3), относящиеся к новой структурной группе манзаминовых алкалоидов, и установлены их химические структуры [7]. Абсолютная стереохимия всех хиральных центров была определена квантово-химическим моделированием. Соединения вызвали значительное снижение уровней активных форм кислорода в стимулированных макрофагах при концентрациях 0,1 и 10 мкМ для **6** и 0,1 мкМ для **7**. Эта активность алкалоидов **6** и **7** аналогична действию некоторых соединений, перспективных для лечения болезни Паркинсона.

Исследование экстрактов из полихеты *Chaetopterus variopedatus* (тип Annelida), собранной в бухте Троицы (зал. Петра Великого), привело к неожиданному открытию

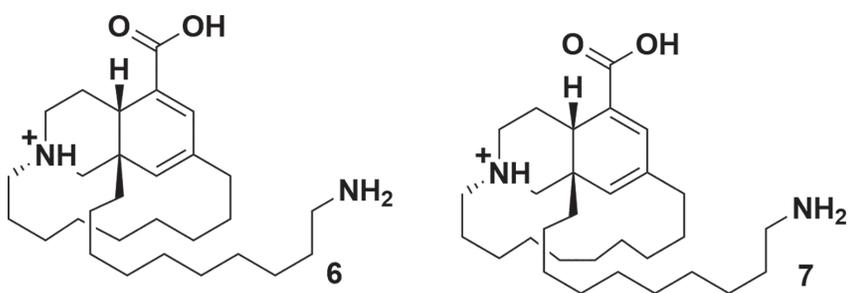


Рис. 3. Структуры лиссендориковых кислот **6** и **7**

бициклических гуанидиновых алкалоидов, монанхорина (**8**) и 6-эпи-монанхорина (**9**) (рис. 4) [14].

В связи с тем, что эти же алкалоиды были ранее обнаружены у морских губок *Monanchora unguiculata* [12] и *Halichondria panicea* [1], мы предположили, что существует микробный продуцент этих соединений [14]. Культивирование микроорганизмов из специального органа – ловчей сети данной полихеты, в которой накапливается основное количество этих веществ, привело к выделению ряда бактериальных штаммов [8]. Исследование экстрактов культивированных бактерий методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и МС на содержание монанхоринов выявило, что они присутствуют в некоторых штаммах рода *Vibrio*. После препаративного культивирования (12 л среды) одного из полученных штаммов *Vibrio* (КММ 8419) из него было выделено это вещество в достаточных количествах для ЯМР-анализа и определено, что этот штамм биосинтезирует 6-эпи-монанхорин. Филогенетическая реконструкция с использованием восьми белок-кодирующих генов показала, что штамм КММ 8419 относится к новому виду из рода *Vibrio* [8].

Цитотоксический гуанидиновый алкалоид монанхоцидин А (**10**), выделенный нами ранее из дальневосточной морской губки *Monanchora pulchra*, имеет 11 асимметрических центров [6]. Для установления абсолютной стереохимии монанхоцидина А необходимо было найти новые подходы, так как известные не помогли решить эту нестандартную задачу. Действительно, эта молекула не содержит хромофоров, вторичных гидроксильных и других групп, которые можно было бы использовать для изучения с применением спектров кругового дихроизма или получением производных с реактивом Мошера для последующего ЯМР-анализа [15]. Рентгеноструктурный анализ также был невозможным, так как органические соединения с таким высоким Н/С соотношением, как правило, не кристаллизуются [13]. Для решения этой задачи мы выполнили гидрогенолиз данного алкалоида под действием NaBH_4 при повышенной температуре и расщепили одну гемиацетальную

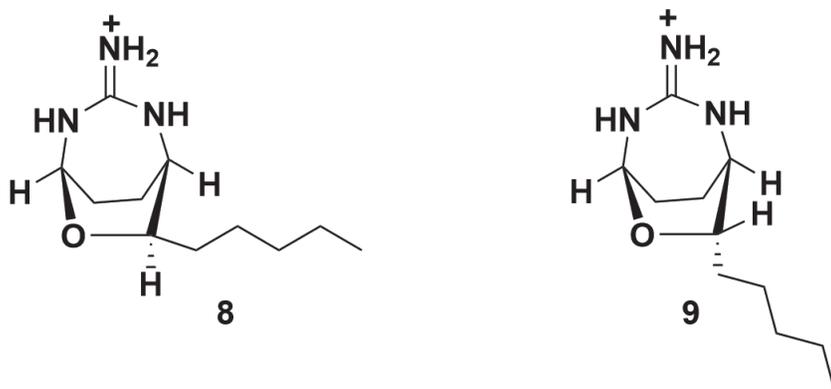


Рис. 4. Структуры бициклических гуанидиновых алкалоидов

и три гемиаминальные связи. В результате из соединения **10** было получено полифункциональное соединение с вторичными гидроксильными группами, которое использовали далее для получения из него тетра-(*S*)-МТРА (**11a**) и тетра-(*R*)-МТРА (**11b**) эфиров (рис. 5). Разница химических сдвигов $\Delta\delta^{SR}$ ($\delta_S - \delta_R$) в ^1H ЯМР-спектрах стереоизомерных **11a** и **11b** показала $5R, 19R, 37S$ абсолютные конфигурации в соединении **10** (рис. 5) [15]. Разница химических сдвигов $\Delta\delta^{SR}$ ($\delta_S - \delta_R$) между **12a** и **12b** указывала на $23R$ конфигурацию. Принимая во внимание ранее установленные данные об относительной стереохимии хиральных центров в этой молекуле, конфигурации асимметрических центров в монанхоцидине А были установлены как $5R, 8S, 10S, 13R, 14S, 15R, 19R, 23R, 37S, 42S, 43R$ (рис. 5) [15]. Эти конфигурации оказались зеркальным отражением тех, которые ранее приписывались пентациклическому гуанидиновому кору монанхоцидинов А–Е [9].

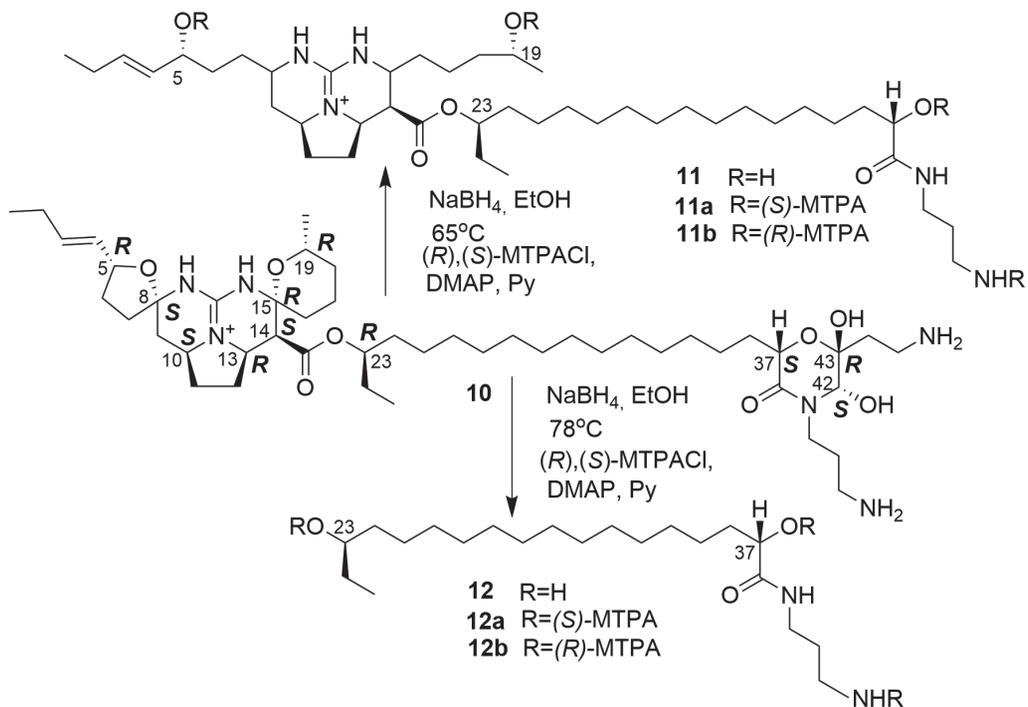


Рис. 5. Получение триола **11**, диола **12** и их МТРА производных (**11a**, **11b**, **12a** и **12b**)

Два новых бромированных граминовых алкалоида **13** и **14** были выделены из гидроида *Abietinaria abietina* (рис. 6) [2]. Они при концентрации 1,6 мкМ активируют NF-κB-зависимую транскрипционную активность в JB6 C141 клетках. Такая их способность открывает возможности создания на основе подобных веществ новых агентов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

В морской губке *Neopetrosia* sp. были обнаружены новые вторичные метаболиты, названные нами неопетрозидами А (**15**) и В (**16**) (рис. 7) [16]. Неопетрозиды (**15**, **16**) являются первыми представителями нового класса пиридиновых нуклеозидов с α-рибозидной связью. Было установлено, что нетоксическое соединение **15** улучшает митохондриальные

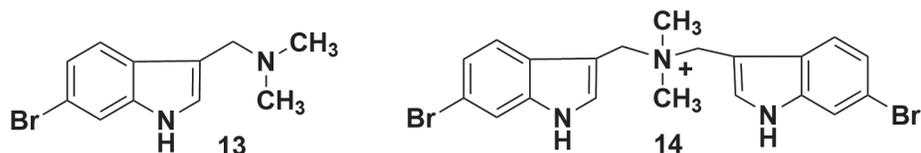


Рис. 6. Структуры алкалоидов из гидроида *Abietinaria abietina*

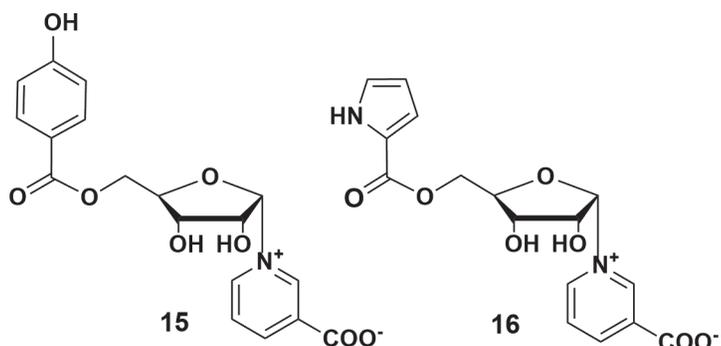


Рис. 7. Структуры необычных пиридиновых нуклеозидов

функции клеток сердечной мышцы и является модельным соединением для создания новых кардиоактивных лекарственных средств.

Экстракты из морской губки *Melonanchora kobjakovae*, собранной во время 41-й экспедиции НИС «Академик Опарин», подверглись дальнейшему изучению благодаря их способности модулировать активность TRPV1 канала. В результате из них были выделены необычные липиды меланоэиды А (17) и В (18) и меланоэины А (19) и В (20) (рис. 8) [4, 5]. Были найдены подходы к точному определению положения функциональных групп и абсолютной конфигурации асимметрического центра при С-2 в этих полифункциональных липидах. Меланоэид А в концентрации 10 мкМ вызывает автофагию в опухолевых клетках человека NCCIT-R, устойчивых к известному противоопухолевому лекарству цисплатину. Он уменьшает экспрессию протеинов LC3В-II и SQSTM1/p62, участвующих в этом процессе. Меланоэид А можно рассматривать в качестве прототипа для создания новых противоопухолевых средств. Меланоэид А ингибирует AP-1- и NF-κB-зависимые транскрипционные активности в клетках JB6 Cl41 в нецитотоксических концентрациях (7,0 и 7,2 мкМ), демонстрируя, таким образом, потенциальную канцерпревентивную активность.

Таким образом, за прошедшие 5 лет (2015–2019) сотрудниками нашей группы в лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН были найдены неизвестные ранее источники биоактивных вторичных метаболитов среди тропических и дальневосточных губок, полихет и гидроидов. Для этого поиска были использованы различные методы, включая биотестирование, химический и спектроскопический анализ их экстрактов и полученных фракций. Были выделены разнообразные по структурам и

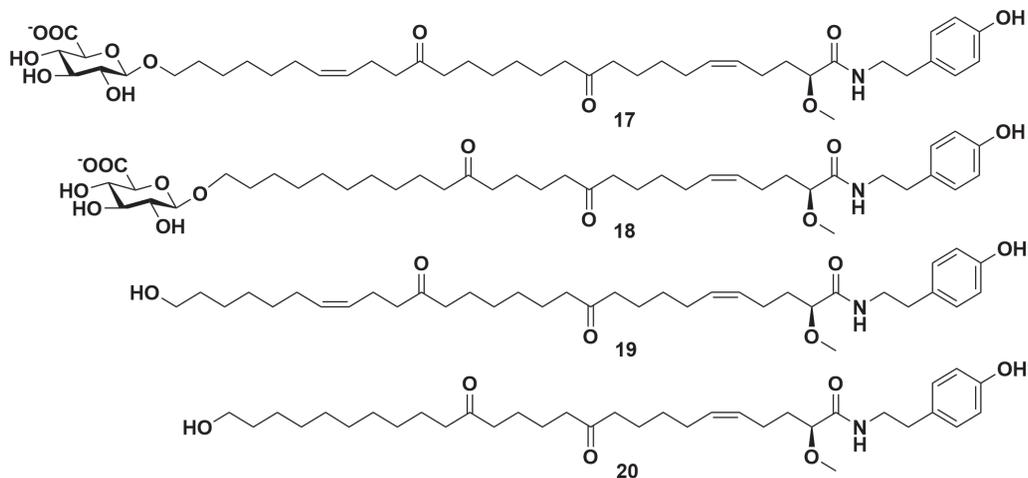


Рис. 8. Структуры необычных липидов из губки *Melonanchora kobjakovae*

интересные по биологическим свойствам новые вторичные метаболиты. Такие соединения, как 5-азаиндолы, неопетрозиды и мелонозиды, являются первыми членами новых структурных групп вторичных метаболитов. Лиссодендориковые кислоты были новыми, биогенетически интересными вариантами базовых структур, которые относят к большой группе манзаминовых алкалоидов.

Были разработаны новые подходы к решению трудных структурных задач, перед которыми оказались бессильными ранее известные самые современные спектральные методы. Так, была определена абсолютная стереохимия 11 асимметрических центров в монанхоцидине – перспективном противоопухолевом веществе. Различными химическими превращениями и встречаемыми синтезами установлены абсолютная стереохимия и точное положение функций в мелонозидах. Были найдены подходы к определению истинного продуцента гуанидиновых алкалоидов, обнаруженных в полихете.

Из всех установленных биологических свойств новых соединений, на наш взгляд, наиболее неожиданным и перспективным является усиление митохондриальных функций в сердечной мышце и способность уменьшать зону некроза при инфаркте при действии найденного нами необычного пиридинового нуклеозида.

Некоторые новые соединения, такие как неопетрозиды А и В, уже были синтезированы в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН в Москве, а другие, возможно, будут синтезированы в ближайшее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdjul D.B., Yamazaki H., Kanno S., Takahashi O., Kirikoshi R., Ukai K., Namikoshi M. Haliclونadiamine derivatives and 6-*epi*-monancherin from the marine sponge *Halichondria panicea* collected at Iriomote Island // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79, N 4. P. 1149–1154.
2. Guzii A.G., Makarieva T.N., Fedorov S.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Krasokhin V.B., Lee H.S., Lee Y.J., Stonik V.A. Gramine-derived bromo-alkaloids activating NF- κ B-dependent transcription from the marine hydroid *Abietinaria abietina* // Nat. Prod. Commun. 2016. Vol. 11, N 9. P. 1263–1265.
3. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Gerasimenko A.V., Udovenko A.A., Dmitrenok P.S., Popov R.S., Golotin V.A., Fedorov S.N., Grebnev B.B., Stonik V.A. Guitarrins A–E and aluminumguitarrin A: 5-azaindoles from the Northwestern Pacific marine sponge *Guitarra fimbriata* // J. Nat. Prod. 2019. Vol. 82, N 6. P. 1704–1709.
4. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Melonoside A: an ω -glycosylated fatty acid amide from the Far Eastern marine sponge *Melonanchora kobjakovae* // Org. Lett. 2016. Vol. 18, N 14. P. 3478–3481.
5. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Popov R.S., Kuzmich A.S., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Kim N.Yu., Stonik V.A. Melonoside B and Melonosins A and B, lipids containing multifunctionalized ω -hydroxy fatty acid amides from the Far Eastern marine sponge *Melonanchora kobjakovae* // J. Nat. Prod. 2018. Vol. 81, N 12. P. 2763–2767.
6. Guzii A.G., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Kuzmich A.S., Dyshlovoy S.A., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Monanchocidin: a new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // Org. Lett. 2010. Vol. 12, N 19. P. 4292–4295.
7. Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovsky A.I., Berdyshev D.V., Pisyagin E.A., Kuzmich A.S., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Makarieva T.N., Stonik V.A. Lissodendoric acids A and B, manzamine-related alkaloids from the Far Eastern sponge *Lissodendoryx florida* // Org. Lett. 2017. Vol. 19, N 19. P. 5320–5323.
8. Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., Isaeva M., Chernysheva N., Popov R., Bystritskaya E., Dmitrenok P., Stonik V. Marine bacterium *Vibrio* sp. CB1-14 produces guanidine alkaloid 6-*epi*-monancherin, previously isolated from marine polychaete and sponges // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, N 4. E213. DOI: 10.3390/md17040213.
9. Makarieva T.N., Tabakmakher K.M., Guzii A.G., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Shubina L.K., Kuzmich A.S., Lee H.S., Stonik V.A. Monanchocidins B-E: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra* // J. Nat. Prod. 2011. Vol. 74, N 9. P. 1952–1958.
10. Makarieva T.N., Ilyin S.G., Stonik V.A., Lyssenko K.A., Denisenko V.A. Pibocin, the first ergoline marine alkaloid from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* sp. // Tetrahedron Lett. 1999. Vol. 40, N 8. P. 1591–1594.
11. Makarieva T.N., Stonik V.A., Dmitrenok A.S., Grebnev B.B., Isakov V.V., Rebachyk N.M., Rashkes Y.W. Varacin and three new marine antimicrobial polysulfides from the Far Eastern ascidian *Polycitor* sp. // J. Nat. Prod. 1995. Vol. 58, N 2. P. 254–258.
12. Meragelman K.M., McKee T.C., McMahon J.B. Monancherin, a bicyclic alkaloid from the sponge *Monanchora unguiculata* // J. Nat. Prod. 2004. Vol. 67, N 7. P. 1165–1167.

13. Molinski T.F., Morinaka B.I. Integrated approaches to the configurational assignment of marine natural products // *Tetrahedron*. 2012. Vol. 68, N 46. P. 9307–9343.
14. Shubina L.K., Makarieva T.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., von Amsberg G., Glazunov V.P., Silchenko A.S., Stonik I.V., Lee H.S., Lee Y.J., Stonik V.A. Absolute configuration and body part distribution of alkaloid 6-*epi*-monanchorin from the marine polychaete *Chaetopterus variopedatus* // *Nat. Prod. Commun.* 2016. Vol. 11, N 9. P. 1253–1257.
15. Shubina L.K., Makarieva T.N., Guzii A.G., Denisenko V.A., Popov R.S., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Absolute configuration of the cytotoxic marine alkaloid monanchocidin A // *J. Nat. Prod.* 2018. Vol. 81, N 4. P. 1113–1115.
16. Shubina L.K., Makarieva T.N., Yashunsky D.V., Nifantiev N.E., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Jeong S.H., Han J., Stonik V.A. Pyridine nucleosides neopetrosides A and B from a marine *Neopetrosia* sp. sponge. Synthesis of neopetroside A and its β -riboside analogue // *J. Nat. Prod.* 2015. Vol. 78, N 6. P. 1383–1389.

Ш.Ш. АФИЯТУЛЛОВ, О.И. ЖУРАВЛЕВА

Совместное культивирование морских грибов-микромикетов – перспективный способ получения новых биоактивных вторичных метаболитов

*Пять новых дикетопиперазиновых алкалоидов семейства нотоамидов, новый дифениловый эфир диорцинол J и новый хроменоловый метаболит оксирапентин L были выделены в результате совместного культивирования грибов *Aspergillus sulphureus* и *Isaria felina*. Структуры выделенных соединений были установлены на основании данных двумерной ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Абсолютные конфигурации алкалоидов определены на основе вычислений спектров электронного кругового дихроизма (ECD) в рамках нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) и сравнения с экспериментальными спектрами. Исследована цитотоксическая активность выделенных соединений.*

Ключевые слова: морские грибы, вторичные метаболиты, пренилированные индольные алкалоиды, оксирапентины, диорцинолы, цитотоксическая активность.

Co-cultivation of marine micromycetes fungi is a promising way of obtaining new bioactive secondary metabolites. Sh.Sh. AFİYATULLOV¹, O.I. ZHURAVLEVA^{1,2} (¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok).

*Five new diketopiperazine alkaloids of the notoamide family, the new diphenyl ether diorcinol J and the new chromene metabolite oxirapentin L were isolated by co-cultivation of *Aspergillus sulphureus* and *Isaria felina* fungi. Structures of the isolated compounds were determined based on two-dimensional NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. The absolute configurations of alkaloids were established on the basis of calculations of the electron circular dichroism (ECD) spectra in the framework of the non-stationary density functional theory (TD-DFT) and comparison of CD spectra with published data. The cytotoxic activity of the isolated compounds was studied.*

Key words: marine fungi, secondary metabolites, prenylated indole alkaloids, oxirapentins, diorcinols, cytotoxic activity.

Введение

Исследование вторичных метаболитов морских грибов является относительно молодой, но быстро развивающейся областью биоорганической химии, к настоящему времени описано около 3000 новых метаболитов. Этот тренд продолжается, и возникла проблема повторного выделения известных грибных соединений [10]. И наоборот, геномные исследования указывают на то, что многие микробные гены кодируют десятки путей

*АФИЯТУЛЛОВ Шамил Шерибзянович – кандидат химических наук, заведующий лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток); ЖУРАВЛЕВА Олеся Игоревна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), младший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: afiyat@piboc.dvo.ru

биосинтеза вторичных метаболитов, которые не экспрессируются при стандартных условиях культивирования в лаборатории [4, 7, 15].

Например, секвенирование гриба *Aspergillus niger*, известного продуцента биоактивных метаболитов, показало, что он содержит генные кластеры, кодирующие 17 нерибосомальных пептидсинтаз и 34 поликетидсинтазы [13]. Поэтому значительные усилия исследователей в последнее время были направлены на разработку новых стратегий и подходов для активации «спящих» генных кластеров с целью увеличения химического разнообразия вторичных микробных метаболитов. Изменение условий культивирования (температура, pH, аэрация, время инкубации, оптимизация источников азота), химический мутагенез, стратегия OSMAC (один штамм – много соединений) – примеры таких стратегий. Еще одним подходом является совместное культивирование, когда одновременное присутствие двух или более микроорганизмов может индуцировать синтез новых соединений. Суть сокультивирования грибов-микромикетов состоит в том, чтобы в определенной степени смоделировать природный микробный комплекс, где микроорганизмы продуцируют биоактивные вторичные метаболиты, необходимые для выживания в конкурентном окружении. Исследования последних лет показывают, что совместное культивирование может приводить к увеличению антибиотической активности в экстрактах, увеличению выходов ранее описанных метаболитов, синтезу аналогов известных соединений, получающихся в результате активации соответствующих путей биосинтеза, и, самое главное, к экспрессии новых путей биосинтеза биоактивных соединений. Так, новый хлорированный бензофеноновый метаболит, песталон (1) (рис. 1), показывающий высокую антибиотическую активность против метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* и ванкомицин-резистентного *Enterococcus faecium*, был выделен при совместном культивировании гриба *Pestalotia* sp. и α -протеобактерии (штамм CNJ-328) [5]. Сокультивирование трехдневной культуры морского гриба *Libertella* sp. с этой же бактерией привело к стимулированию биосинтеза четырех новых дитерпеноидов – либертелленонов А–D (2–5), проявляющих высокую цитотоксичность в отношении клеток человеческой аденокарциномы HCT-116 [12]. Два новых поликетиды 6 и 7 с беспрецедентным углеродным скелетом были получены при совместном культивировании морских изолятов грибов *Penicillium* sp. и *Trichoderma* sp. [8]. Сокультивирование грибов *Phomopsis* sp. и *Alternaria* sp., выделенных из мангровых растений, привело к выделению нового циклического тетрапептида 8 с высокой антифунгальной активностью [9].

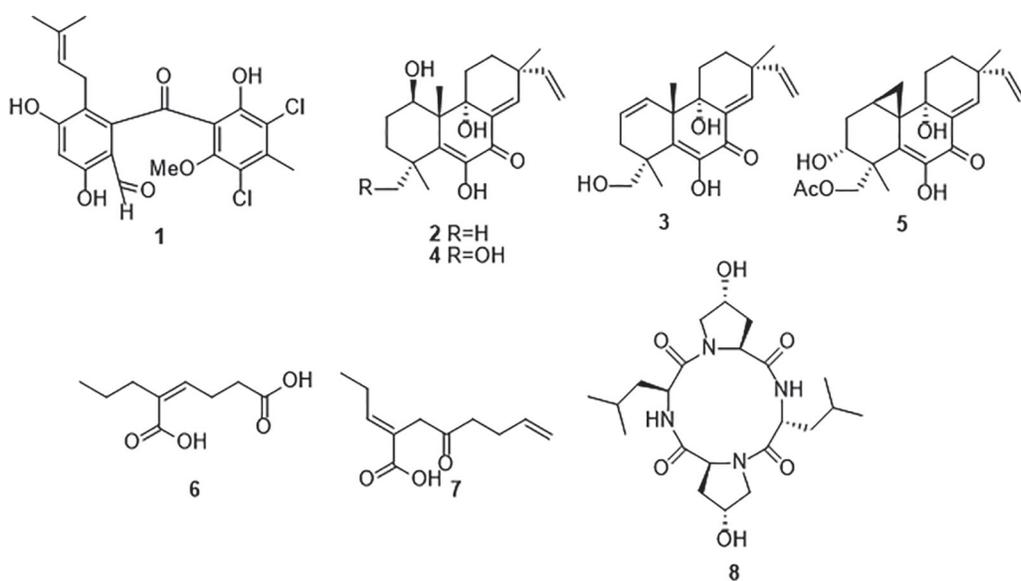


Рис. 1. Структуры соединений 1–8

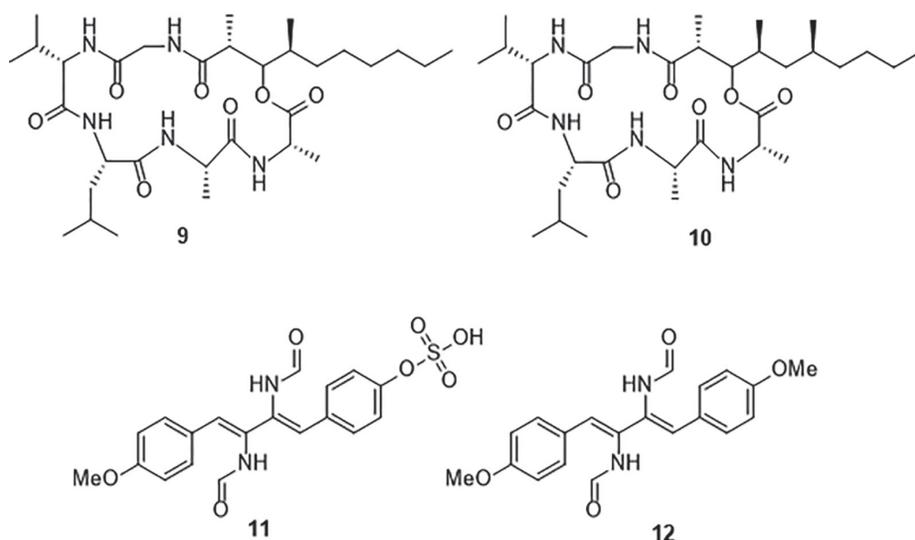


Рис. 2. Структуры соединений 9–12

Во всех приведенных примерах ни один из указанных грибов не продуцировал эти метаболиты при раздельном выращивании в тех же условиях. Кроме того, совместное культивирование морского гриба *Emericella* sp. и актинобактерии *Salinispora arenicola* привело к увеличению в 100 раз биосинтеза циклических депсипептидов эмерицелламидов А (9) и В (10) (рис. 2), проявляющих высокую активность в отношении клинических изолятов метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [12]. Эти пептиды продуцировались самим грибом при раздельном культивировании в минорных количествах. Новые аналоги цитотоксических N-формилалкалоидов фумиформамиды 11 и 12 как результат активации латентных биосинтетических путей гриба *Aspergillus fumigatus* и бактерии *Streptomyces peucetius* были выделены при их совместной ферментации [26].

Во всех приведенных примерах культивирование микроорганизмов проводили в жидких средах. В то же время имеются лишь несколько работ по совместному культивированию грибов-микромикетов на твердых средах [3, 14]. Для того чтобы исследовать биосинтетический потенциал грибов, растущих в морской среде обитания, мы недавно начали программу скрининга твердофазного совместного культивирования штаммов из Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН.

Результаты и обсуждение

Ранее из этилацетатного экстракта морского изолята гриба *Aspergillus sulphureus* КММ 4640 было выделено новое декалиновое производное, декумбенон С, который в концентрации 250 нМ эффективно ингибирует формирование и рост колоний клеток человеческой меланомы SK-Mel-5 (неопластическая трансформация клеток) и может рассматриваться как перспективное антиопухолевое средство [25]. Из гриба *Isaria felina* КММ 4639 выделены десять новых хромоновых производных – оксирапентинов В–К, бензофуран акремин S и пирановый поликетид исарикетид А. Показано, что последний обладает цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток HL-60 и ТНР-1, сопоставимой с активностью цисплатина [16, 23].

Мы предприняли совместное культивирование данных штаммов грибов с целью увеличения выходов ранее выделенных активных соединений или получения новых метаболитов. *A. sulphureus* культивировали в течение 7 сут на специально модифицированной рисовой среде и инокулировали его *I. felina*, после чего грибы росли совместно в течение

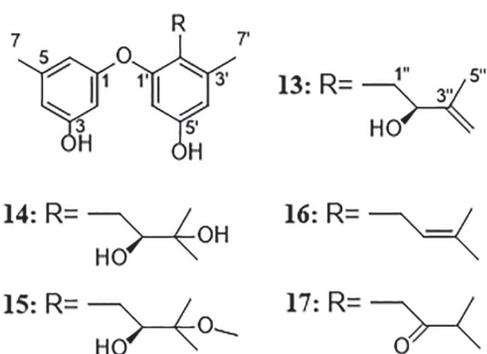


Рис. 3. Структуры соединений 13–17

двух недель. Этилацетатный экстракт полученных культур последовательно разделили на колонках с силикагелем, элюируя образующиеся метаболиты последовательно гексаном и системами гексан–этилацетат (ступенчатый градиент, 20 : 1 → 1 : 1).

Из фракции гексан–этилацетат 15 : 1 методами последовательной хроматографии на сефадексе LH-20 и обращенно-фазовой ВЭЖХ были выделены новый диорцинол J (13) и четыре известных диорцинола В–Е (14–17) [1] (рис. 3). Абсолютная конфигурация диорцинола J установлена на основании

данных NOESY-спектров и с использованием модифицированного метода Мошера.

Исследованы цитотоксическая активность выделенных соединений, а также их способность усиливать экспрессию белка теплового шока Hsp70 в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Инкубирование клеток карциномы Эрлиха с веществами 13–17 в нетоксической концентрации (10 μ M) не приводило к увеличению в клетках содержания белка теплового шока Hsp70. Однако анализ полученных после иммуноокрашивания мембран позволяет предположить, что соединение 13 в этой концентрации понижает уровень Hsp70 в клетках карциномы Эрлиха, что делает его перспективным для дальнейшего изучения в качестве противоопухолевого препарата.

Следует отметить, что из экстракта изолята гриба *A. sulphureus* ранее уже выделили один из диорцинолов.

Из среднеполярных фракций (гексан–этилацетат, 5 : 1, 1 : 1) методами последовательной хроматографии на сефадексе LH-20, нормально- и обращенно-фазовой ВЭЖХ получили пять новых пренилированных индольных алкалоидов семейства нотоамидов (18–22) (рис. 4) [2].

Молекулярная формула соединения 18 была установлена как $C_{26}H_{31}N_3O_5$ на основании данных HRESIMS m/z 466.2341 $[M + H]^+$ и была подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы ^{13}C ЯМР-спектра 18 оказались очень близки соответствующим

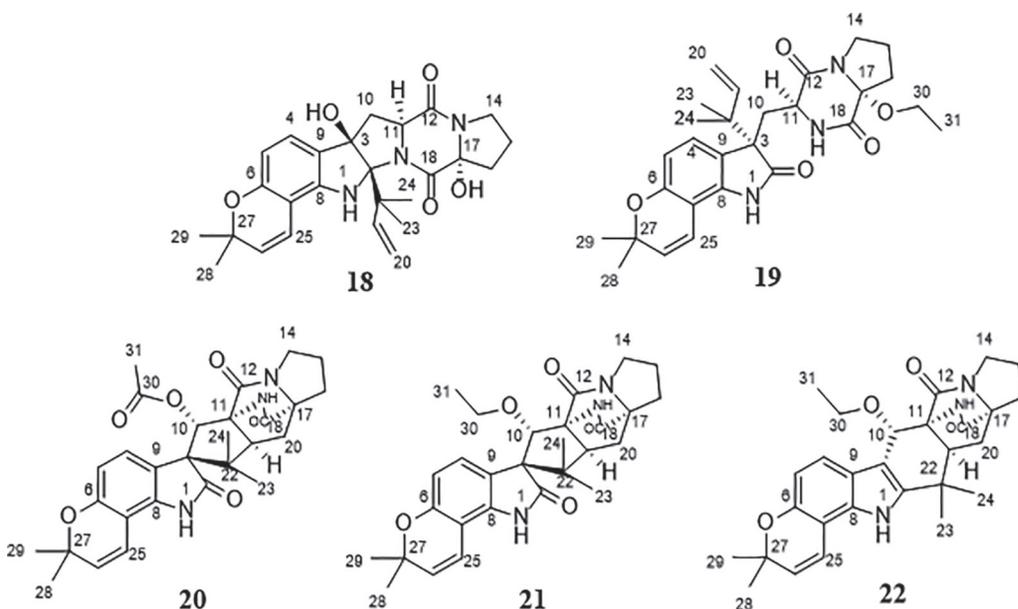


Рис. 4. Структуры соединений 18–22

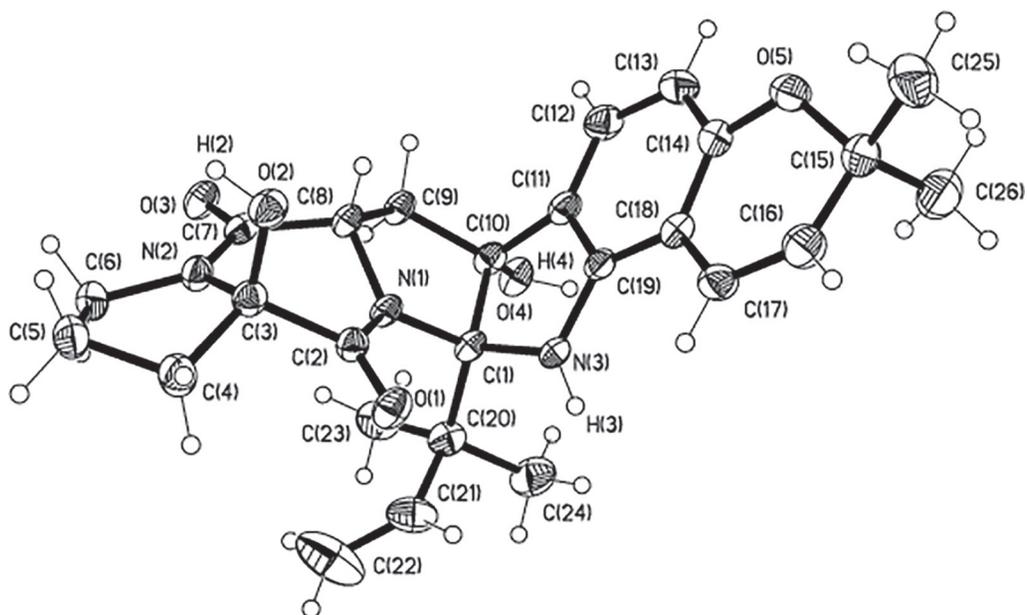


Рис. 5. Кристаллографическая структура соединения **18**

сигналам нотоамида **D** [6], за исключением сигналов атомов C-11 и C-15–C-18 в дикетопиперазиновой части. Разница в молекулярных массах в 16 единиц между **18** и нотоамидом **D** и НМВС-корреляции H-15a,b/C-16 (δ_c 37.9), C-17 (δ_c 90.3) и H-16b/C-14 (δ_c 44.8), C-15 (δ_c 20.7), C-16, C-17 и C-18 (δ_c 171.2) позволили выяснить положение спиртовой функции при атоме C-17. Молекулярная структура и относительная конфигурация **18** были подтверждены рентгеноструктурным анализом, который был выполнен на монокристалле состава $(C_{26}H_{31}N_3O_5)_2 \cdot 3H_2O$, полученном при перекристаллизации из смеси ацетон–вода (рис. 5). Абсолютная конфигурация **18** была установлена на основании данных рентгеноструктурного анализа и вычислений спектров электронного кругового дихроизма (ЭКД) в рамках нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT). Сравнение статистически усредненного теоретического КД-спектра **18** с соответствующим экспериментальным спектром (рис. 6) показало, что оба они качественно подобны

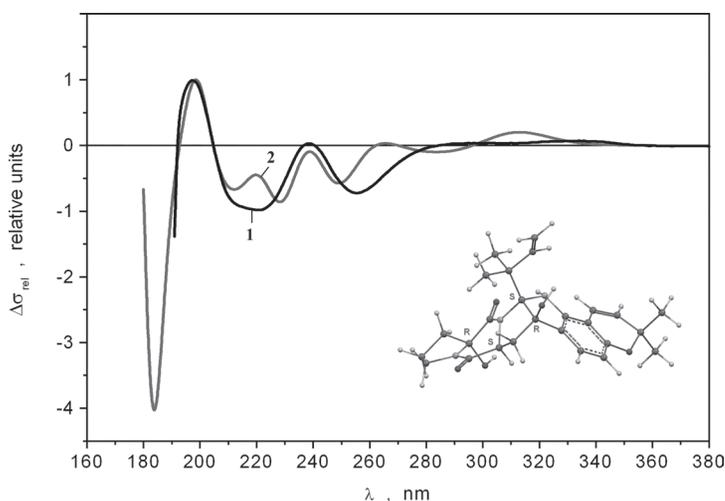


Рис. 6. Нормализованные экспериментальные (1) и статистически усредненные (2) ЭКД спектры **18**

в области $\lambda \geq 200$ нм, где наблюдались выраженные эффекты Коттона. Таким образом, абсолютная конфигурация **18** была определена как 2*S*,3*R*,11*S*,17*R*. Соединение **18** было названо 17-гидроксинотоамидом D.

Молекулярная формула соединения **19** была установлена как $C_{28}H_{35}N_3O_5$ на основании данных HRESIMS m/z 516.2469 $[M + Na]^+$ и была подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Спектры 1H и ^{13}C ЯМР **19** близко соответствовали спектрам нотоамидов M [18] и Q [20]. Корреляции, наблюдаемые в COSY-спектре, и НМВС-корреляции H_3 -31/ C -30 (δ_c 58.8) и H_2 -30/ C -17 (δ_c 90.4) позволили установить наличие этильной группы при C -17. NOE-корреляции H -11/ H_2 -30, H_3 -31 в **19** указывали, что дикетопиперазиновое кольцо находится в *cis* конфигурации. КД-спектр **19** был практически идентичен спектрам нотоамидов M и Q, и, таким образом, его абсолютная конфигурация была установлена как 3*S*, 11*S*, 17*R*. Соединение **19** назвали 17-*O*-этилнотоамидом M.

Молекулярная формула соединения **20** была установлена как $C_{28}H_{31}N_3O_6$ на основании данных HRESIMS m/z 528.2112 $[M + Na]^+$ и была подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. 1H и ^{13}C ЯМР-спектральные данные **20** были близки к соответствующим данным для склеротиамида [21], за исключением сигнала атома H -10. Наблюдаемые НМВС-корреляции и разница молекулярных масс в 42 единицы между **20** и склеротиамидом указывали на присутствие ацетоксильной группы при C -19 в **20**. NOE корреляции H -21/ NH -19, H_3 -23 и H -10/ H -4, H_3 -24 устанавливали относительную конфигурацию **20**. В КД-спектре **20** имелись характерные эффекты Коттона при $\lambda_{202} - 11,12$, $\lambda_{225} + 7,96$ и $\lambda_{240} - 3,56$, которые были близки соответствующим эффектам для нотоамида H [19]. Таким образом, абсолютная конфигурация **20** была установлена как 3*R*, 10*S*, 11*R*, 17*S*, 21*S*. Соединение **20** было названо 10-*O*-ацетилсклеротиамидом.

Молекулярная формула соединения **21** была установлена как $C_{28}H_{33}N_3O_5$ на основании данных HRESIMS m/z 514.2316 $[M + Na]^+$ и была подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы ^{13}C ЯМР-спектра **21** оказались очень близки соответствующим сигналам для соединения **20**, за исключением сигнала атома C -10. Корреляции, наблюдаемые в COSY-спектре, и НМВС-корреляции H_3 -31/ C -30 (δ_c 67.9) и H_2 -30/ C -10 (δ_c 80.3) предполагают наличие этилового эфира при C -10 в **21**. Относительная конфигурация **21** была определена на основании наблюдаемых NOE-корреляций между H -21 и H_3 -23, NH -19 и между H -10 и H_3 -24, H -4. КД-спектр **21** был практически идентичен спектру соединения **20**, устанавливая его абсолютную конфигурацию как 3*R*, 10*S*, 11*R*, 17*S*, 21*S*. Соединение **21** было названо 10-*O*-этилсклеротиамидом.

Молекулярная формула соединения **22** была установлена как $C_{28}H_{33}N_3O_4$ на основании данных HRESIMS m/z 498.2332 $[M + Na]^+$ и была подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. 1H и ^{13}C ЯМР-спектральные данные **22** были близки к таковым для нотоамида F [19], за исключением сигнала C -10. Положение этилового эфира при C -10 определяли так же, как и для соединения **21**. В КД-спектре **22** имелись характерные эффекты Коттона при $\lambda_{203} - 16,25$, $\lambda_{224} + 16,59$ и $\lambda_{247} - 1,77$, которые были в хорошем соответствии с эффектами для нотоамида F. Таким образом, абсолютная конфигурация **22** была установлена как 10*S*, 11*R*, 17*S*, 21*S*. Соединение **22** названо 10-*O*-этилнотоамидом R.

Мы наблюдали соединения **19** и **21** в исходном этилацетатном экстракте совместной культуры грибов, используя метод ВЭЖХ-МС. 10-*O*-этиловый эфир нотоамида R (**22**) не был обнаружен в этом экстракте. Таким образом, **22** может быть не природным метаболитом, а возникшим в процессе выделения.

Кроме новых соединений из этилацетатного экстракта сокультуры грибов были также получены (–)-нотамид В, нотамид С, дегидронотамид С, нотамид D, нотамид F, нотамид Q, 17-эпи-нотамид Q, нотамид M и склеротиамид.

Исследовано действие ряда выделенных алкалоидов на формирование колоний клеток 22Rv1 простаты человека. Показано, что алкалоиды 17-*O*-этилнотоамид M и нотамид M в концентрации 10 мкМ ингибируют формирование колоний этих клеток на 25 и 55 % соответственно.

Также проведено обратное совместное культивирование этих двух грибов с инокуляцией мицелия гриба *A. sulphureus* к семидневной культуре *I. felina*, выращенной на рисовой среде. Из этилацетатного экстракта совместной культуры был получен новый оксирапентин L (**23**) (рис. 7) совместно с известными оксирапентинами А, В, D-I [17].

Спектр ESIMS высокого разрешения для соединения **23** содержит пик $[M + Na]^+$ при m/z 351.0969 с характерным для одного атома хлора изотопным расщеплением. Эти данные указывают на молекулярную формулу $C_{16}H_{21}ClO_5$ (рассчитано для $C_{16}H_{21}ClNaO_5$, 351.0970), соответствующую шести эквивалентам двойной связи.

Прямое сравнение спектров 1H и ^{13}C ЯМР-соединения **23** со спектрами известного оксирапентина Е [22] выявило ряд сходств. Спектры включают сигналы двух метилов (δ_C 25.1, 22.1, δ_H 1.40, 1.25), одного метилена (δ_C 34.9, δ_H 2.52, 1.68), одного оксигенированного метина (δ_C 72.6, δ_H 3.72) и одного четвертичного sp^3 -гибридизованного атома углерода, связанного с кислородом (δ_C 76.1). НМВС-корреляции от Н-2 (δ_H 3.72) к С-3 (δ_C 34.9) и С-4 (δ_C 57.8), от Н₂-3 (δ_H 2.52, 1.68) к С-1 (δ_C 76.1), С-2 (δ_C 72.6), С-4 и С-9 (δ_C 70.7), а также НМВС кросс-пики от Н₃-10 (δ_H 1.25) и Н₃-11 (δ_H 1.40) к С-1 и С-2 подтверждают, что пирановое кольцо в соединении **23** идентично таковому в структуре оксирапентинов Е и G [23]. Строение цикла было установлено НМВС-корреляциями от Н-5 (δ_H 3.35) к С-4, С-6 (δ_C 64.9) и С-7 (δ_C 111.4), от Н-6 (δ_H 4.90) к С-4, С-5 (δ_C 63.7), С-7 и С-8 (δ_C 71.0) и от Н-9 (δ_H 4.13) к С-4, С-5, С-7 и С-8. Структура и положение боковой цепи были определены НМВС-корреляциями от Н-4' к С-7, С-2' (δ_C 111.8), С-3' (δ_C 136.2) и С-5' (δ_C 20.9), от Н₃-5' (δ_H 1.90) к С-2', С-3' и С-4' (δ_C 116.4), а также от Н-6 к С-1' (δ_C 198.2). Эти данные показывают, что соединение **23** является производным оксирапентина G с метилбутадиенилиденовой боковой цепью. Положение атома хлора при С-2' подтверждается величиной химического сдвига сигнала С-2' в соединении **23**, сравнимой с подобной в спектре известного трункатеола А [24].

ROESY-корреляции Н-2/Н₃-10 и Н₃-11, Н-3 β /Н-5 и Н-3 α /Н-9, а также несомненное биогенетическое родство с известными оксирапентинами G и F [23] позволили предложить абсолютные конфигурации всех хиральных центров соединения **23**, как изображено на рис. 7. Следует отметить, что недавно были опубликованы несколько структурно близких оксирапентинам соединений, содержащих алленовую боковую цепь [24]. Тем не менее оксирапентин L является первым и единственным примером природного соединения с хлороалленовым фрагментом.

Показано, что оксирапентин L не проявляет цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток рака простаты человека 22Rv1, PC-3 и LNCaP и мышечных нетрансформированных спленоцитов и эритроцитов в концентрации до 100 мкМ.

Материалы и методы

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 343 (Германия). Спектры ЯМР 1H и ^{13}C регистрировали в $CDCl_3$ на спектро스코пах Bruker Avance-500 (500.13 и 125.77 МГц соответственно) и Bruker Avance III-700 (700.13 и 176.04 МГц соответственно), внутренний стандарт – Me_4Si . Масс-спектры получены на масс-спектрометре Maxis Impact II Q-TOF (Bruker). ЭКД спектры были измерены с помощью Chirascan-Plus CD спектрометра в метаноле. Колоночную хроматографию проводили на сефадексе LH-20 (GE Healthcare, Швеция). Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AT (Япония) на колонках Supelco Discovery C-18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм), YMC ODS-AM (5 мкм, 10 × 250 мм), YMC-Pack SIL (5 мкм, 10 × 250 мм). Для ТСХ использовали пластинки с закрепленным слоем силикагеля (5–17 мкм, Sorbfil, Россия).

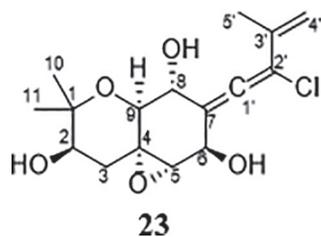


Рис. 7. Структура соединения **23**

Штамм *Isaria felina* был выделен из образца донных осадков (Южно-Китайское море, побережье Вьетнама, глубина 10 м), штамм *Aspergillus sulphureus* – из илистого песка восточносахалинского шельфа (Охотское море, глубина 26 м). Штаммы были идентифицированы на основании морфологических данных к.б.н. Н.Н. Киричук (ТИБОХ ДВО РАН), хранятся в Коллекции морских микроорганизмов, ТИБОХ, Владивосток, Россия, с кодами КММ 4640 для *A. sulphureus* и КММ 4639 для *I. felina*.

Ферментацию проводили при 25 °С в 30 колбах Эрленмейера (500 мл), каждая из которых содержала 20 г риса, 20 мг дрожжевого экстракта, 10 мг $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ и 40 мл натуральной морской воды.

Таким образом, при совместном твердофазном культивировании морских грибов-микромикетов *A. sulphureus* и *I. felina* были получены пять новых алкалоидов семейства нотоамидов, новый оксирапентин L и новый диорцинол J. Ранее эти соединения при раздельном культивировании грибов не выделялись.

Работа выполнена с использованием культур Коллекции морских микроорганизмов (КММ ТИБОХ ДВО РАН) и оборудования Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ) ТИБОХ ДВО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журавлева О.И., Киричук Н.Н., Денисенко В.А., Дмитренко П.С., Юрченко Е.А., Минько Е.М., Афиятуллово Ш.Ш. Новый диорцинол J, полученный при совместном культивировании морских грибов *Aspergillus sulphureus* и *Isaria felina* // Химия природ. соединений. 2016. № 2. С. 200–202.
2. Afiyatullovo S.S., Zhuravleva O.I., Antonov A.S., Berdyshev D.V., Pivkin M.V., Denisenko V.A., Popov R.S., Gerasimenko A.V., von Amsberg G., Dyshlovoy S.A., Leshchenko E.V., Yurchenko A.N. Prenylated indole alkaloids from co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sulphureus* and *Isaria felina* // J. Antibiot. 2018. Vol. 71, N 10. P. 846–853.
3. Bertrand S., Schumpp O., Bohni N., Monod M., Gindro K., Wolfender J.-L. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca* // J. Nat. Prod. 2013. Vol. 76. P. 1157–1165.
4. Brakhage A.A., Schroeckh V. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters // Fungal Genet. Biol. 2011. Vol. 48. P. 15–22.
5. Cueto M., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W., Lobkovsky E., Clardy J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. P. 1444–1446.
6. Kato H., Yoshida T., Tokue T., Nojiri Y., Hirota H., Ohta T., Williams R.M., Tsukamoto S. Notoamides A–D: Prenylated indole alkaloids isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. // Angew. Chem. Int. Ed. 2007. Vol. 46, N 13. P. 2254–2256.
7. Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. Fungal secondary metabolism – From biochemistry to genomics // Nat. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 3. P. 937–947.
8. Kossuga M.H., Ferreira A.G., Sette L.D., Berlinck R.G.S. Two polyketides from a co-culture of two marine-derived fungal strains // Nat. Prod. Comm. 2013. Vol. 8, N 6. P. 721–724.
9. Li C., Wang J., Luo C., Ding., Cox D.G. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine-mangrove fungi // Nat. Prod. Res. 2014. Vol. 28, N 9. P. 616–621.
10. Marmann A., Aly A.H., Lin W.H., Wang B.G., Proksch P. Co-cultivation – a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms // Mar. Drugs. 2014. Vol. 12. P. 1043–1065.
11. Oh D.-C., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture // J. Nat. Prod. 2007. Vol. 70. P. 515–520.
12. Oh D.-C., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W. Libertellenones A–D: Induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition // Bioorg. Med. Chem. 2005. Vol. 13. P. 5267–5273.
13. Pel H.J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 // Nat. Biotechnol. 2007. Vol. 25. P. 221–231.
14. Pettit R.K. Mixed fermentation for natural product drug discovery // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 83, N 1. P. 19–25.
15. Schneider P., Misiek M., Hoffmeister D. In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites // Mol. Pharmacol. 2008. Vol. 5, P. 234–242.
16. Smetanina O.F., Yurchenko A.N., Afiyatullovo Sh.Sh., Kalinovsky A.I., Pushilin M.A., Khudyakova Yu.V., Slinkina N.N., Ermakova S.P., Yurchenko E.A. Oxirapentyns B–D produced by a marine sediment-derived fungus *Isaria felina* (DC.) Fr. // Phytochem. Lett. 2012. Vol. 5. P. 165–169.

17. Smetanina O.F., Yurchenko A.N., Ivanets E.V., Kalinovsky A.I., Khudyakova Y.V., Dyshlovoy S.A., Amsberg G., Yurchenko E.A., Afiyatullof Sh.Sh. Unique prostate cancer-toxic polyketides from marine sediment-derived fungus *Isaria felina* // J. Antibiot. 2017. Vol. 70. P. 856–858.
18. Tsukamoto S., Kawabata T., Kato H., Greshock T.J., Hirota H., Ohta T., Williams R.M. Isolation of antipodal (-)-versicolamide B and notoamides L-N from a marine-derived *Aspergillus* sp. // Org. Lett. 2009. Vol. 11, N 6. P. 1297–1300.
19. Tsukamoto S., Kato H., Samizo M., Nojiri Y., Onuki H., Hirota H., Ohta T. Notoamides F–K, prenylated indole alkaloids isolated from a marine-derived *Aspergillus* sp. // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71, N 12. P. 2064–2067.
20. Tsukamoto S., Umaoka H., Yoshikawa K., Ikeda T., Hirota H. Notoamide O, a structurally unprecedented prenylated indole alkaloid, and notoamides P-R from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. // J. Nat. Prod. 2010. Vol. 73, N 8. P. 1438–1440.
21. Whyte A.C., Gloer J.B., Wicklow D.T., Dowd P.F. Sclerotiamide: A new member of the paraherquamide class with potent antiinsectan activity from the sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum* // J. Nat. Prod. 1996. Vol. 59, N 11. P. 1093–1095.
22. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Khudyakova Y.V., Kirichuk N.N., Chaikina E.L., Anisimov M.M., Afiyatullof S.S. New oxirapentyn E from marine isolate of the fungus *Isaria felina* // Chem. Nat. Compd. 2013. Vol. 49, N 5. P. 857–860.
23. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Kalinovsky A.I., Pushilin M.A., Glazunov V.P., Khudyakova Y.V., Kirichuk N.N., Ermakova S.P., Dyshlovoy S.A., Yurchenko E.A., Afiyatullof S.S. Oxirapentyns F–K from the Marine-Sediment-Derived Fungus *Isaria felina* KMM 4639 // J. Nat. Prod. 2014. Vol. 77. P. 1321–1328.
24. Zhao Y., Si L., Liu D., Proksch P., Zhou D., Lin W. Truncateols A–N, new isoprenylated cyclohexanols from the sponge-associated fungus *Truncatella angustata* with anti-H₁N₁ virus activities // Tetrahedron. 2015. Vol. 71, N 18. P. 2708–2718.
25. Zhuravleva O.I., Afiyatullof Sh.Sh., Vishchuk O.S., Denisenko V.A., Slinkina N.N., Smetanina O.F. Decumbenone C, a new cytotoxic decaline derivative from the marine fungus *Aspergillus sulphureus* KMM 4640 // Arch. Pharm. Res. 2012. Vol. 35. P. 1757–1762.
26. Zuck K.M., Shipley S., Newman D.J. Induced production of N-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius* // J. Nat. Prod. 2011. Vol. 74. P. 1653–1657.

Н.И. КУЛЕШ, С.А. ФЕДОРЕЕВ, М.В. ВЕСЕЛОВА,
В.А. ДЕНИСЕНКО, В.П. ГРИГОРЧУК

Водорастворимые изофлавоноиды из корней *Maackia amurensis*

Из коры корней *Maackia amurensis* выделены семь изофлавоноидов, включая пять новых гликозидов. Их структуры определены как 4'-O-гентиобиозид даидзина, 4'-O-β-D-глюкопиранозид 7-O-гентиобиозилдаидзеина, 4'-O-β-D-глюкопиранозид 7-O-гентиобиозилгенистеина, 7-O-гентиобиозид 3'-метоксидаидзеина и 7-O-гентиобиозид каликосина. Изофлавоноиды 4'-O-β-D-глюкопиранозиды даидзина и генистина в корнях *M. amurensis* идентифицированы впервые.

Ключевые слова: *Maackia amurensis*, изофлавоноиды, гликозиды.

Water soluble isoflavonoids from *Maackia amurensis* roots. N.I. KULESH, S.A. FEDOREEV, M.V. VESELOVA, V.A. DENISENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok), V.P. GRIGORCHUK (A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok).

Seven isoflavonoids, including five new glycosides, were isolated from bark of *Maackia amurensis* roots, and their structures were identified as daidzin-4'-O-gentiobioside, 7-O-gentiobiosyldaidzein-4'-O-β-D-glucopyranoside, 7-O-gentiobiosylgenistein-4'-O-β-D-glucopyranoside, 3'-methoxydaidzein-7-O-gentiobioside and kalikoin-7-O-gentiobioside. In the roots of *M. amurensis*, the isoflavonoids 4'-O-β-D-glucopyranosides of daidzin and genistin were found for the first time.

Key words: *Maackia amurensis*, isoflavones, glycosides.

Введение

Хорошо известно, что лекарственные средства, полученные из растений, обладают более мягким воздействием на организм человека, что позволяет применять их на протяжении длительного времени, не опасаясь серьезных осложнений. Немаловажно и то, что производство таких препаратов требует значительно меньших экономических и финансовых затрат.

Экстракты лекарственных растений обладают разным фармакологическим эффектом. В последние годы у ряда экстрактов таких растений или выделенных из них соединений с выраженным антиоксидантным действием в экспериментах *in vitro* и *in vivo* были выявлены антикоагуляционные и антитромбоцитарные свойства. Во многих растениях обнаружены также эстрогенные свойства, обусловленные наличием в их составе изофлавонов и лигнанов. К таким растениям относится и маакия амурская (*Maackia amurensis* Rupert et Maxim.).

КУЛЕШ Надежда Ивановна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, *ФЕДОРЕЕВ Сергей Александрович – доктор химических наук, заведующий лабораторией, ВЕСЕЛОВА Марина Владимировна – кандидат химических наук, научный сотрудник, ДЕНИСЕНКО Владимир Анатольевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), ГРИГОРЧУК Валерия Петровна – ведущий инженер (Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: fedoreev-s@mail.ru

M. amurensis широко распространена в Приморском крае, на северо-востоке Китая и в Северной Корее. Растение содержит большое количество полифенолов, обладающих выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, гепатопротективными и другими свойствами. Из древесины были выделены изофлавоны, птерокарпаны, мономерные, димерные стилбены и другие соединения, составляющие полифенольный комплекс субстанции медицинского препарата «Максар®», разработанного и зарегистрированного в Российской Федерации сотрудниками лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток) в качестве гепатопротективного средства (Р N003294/01) [1, 2, 14]. «Максар» обладает также антитромбогенными, антитромбоцитарными и противоопухолевыми свойствами [12, 13]. Для более эффективного применения этого уникального реликтового растения в фармацевтической промышленности важно было оценить возможность использования других его органов, например корней, в качестве альтернативного самовозобновляемого источника сырья для производства лекарственных средств.

Корни *M. amurensis*, в отличие от древесины, содержат комплекс из 12 гликозидных форм изофлавонов и птерокарпанов. В его состав входят 7-*O*-гентиобиозиды даидзеина, генистеина, афромозина, псевдобаптигенина, формонетина, 5-*O*-метилгенистеина, 3-*O*-гентиобиозиды маакиаина и медикарпина, даидзин, генистин, 7-*O*-примверозилформонетин и 7-*O*-примверозилпсевдобаптигенин [8, 17].

Комплекс изофлавоноидов из корней *M. amurensis* обладает выраженными антиоксидантными и гепатопротективными свойствами и является перспективным для создания на его основе новых фармацевтических средств [8, 9, 11, 15, 17]. При CCl_4 -гепатите этот комплекс нормализует показатели липидного обмена печени [9, 11], способствует снижению активности маркерных ферментов цитолиза и удельной массы печени, обеспечивает сохранение уровня глюкозы в крови и окисленных никотинамидных коферментов, нормализует содержание пирувата и лактата в печени животных. В восстановлении реакций углеводного и липидного обмена печени действие препарата, полученного на основе изофлавоноидов из корней маккии амурской, оказалось более эффективным, чем эталонных гепатопротекторов легалона и максара [8, 11].

В литературе имеются сведения о ди-, три- и тетрагликозидах изофлавоноидов в растениях сем. Fabaceae. Такие конъюгированные формы изофлавоноидов получают при обработке изофлавонов ферментами сем. гликозилтрансфераз [20]. Изофлавоны даидзеин и генистеин, присутствующие в растениях сем. Fabaceae почти исключительно в виде гликозидов, из-за их большой молекулярной массы не поглощаются клетками эпителия кишечника и поэтому не способны всасываться в желудочно-кишечном тракте без соответствующих метаболических преобразований, которые начинаются в тонком кишечнике, продолжаются в печени и завершаются в толстом кишечнике при участии кишечной микрофлоры. Превращение гликозидов изофлавонов, в том числе гентиобиозида формонетина [7], в биоактивные агликоны осуществляется благодаря действию кишечных β -глюкозидаз. Затем эти агликоны доводятся до периферического кровообращения. Биотрансформация изофлавоноидов микрофлорой кишечника приводит к образованию не только биоактивных агликонов, но и их конъюгированных форм в виде глюкуронидов и сульфатов, которые обнаруживаются в крови и тканях животных [7]. Конъюгаты этих изофлавонов могут обладать биологической активностью (антиоксидантной, гепатопротекторной, антитромбоцитарной, антикоагулянтной и др.) и служить перспективным источником биологически активных соединений [7, 18, 19]. В то же время свободные агликоны при попадании в организм животных в основном сорбируются на стенках желудка и почти не достигают кишечника, что существенно снижает их биологическую активность. Гликозидные формы изофлавонов лишены этого недостатка. Благодаря более высокой растворимости в воде по сравнению с агликонами они легко проникают в кишечник, где под воздействием микрофлоры превращаются в биоактивные молекулы.

Новыми препаратами из корней *M. amurensis* могут стать либо комплекс изофлавоноидов, проявляющий более выраженные гепатопротекторные свойства, чем препараты «Максар®» и «Карсил®», либо отдельные его компоненты, например 7-*O*-гентиобиозид формонетина (ГБФ). Изофлавоноиды из корней *M. amurensis* снижают АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов [4, 6, 10], а препарат ГБФ существенно изменяет показатели коагуляционного гемостаза, удлиняя тромбопластиновое время, уменьшая коагуляцию и свертывание крови и увеличивая протромбиновое время [3, 5, 6]. Гипокоагуляционный эффект ГБФ реализовывался в торможении реакций внутреннего и внешнего путей свертываемости крови. ГБФ в экспериментах *in vivo* проявлял выраженные гипокоагуляционный и антитромбоцитарный эффекты в дозе 25 мг/кг и не вызывал у экспериментальных животных каких-либо токсических эффектов в дозах более чем 100 мг/кг [3, 4, 6].

Методы

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были сняты на приборах Bruker AVANCE III DRX-700 и DRX-500 (Германия) в ДМСО- d_6 при 30 °С. Значения химических сдвигов (δ) и КССВ (J) приведены в миллионных долях (мд) и герцах (Гц) соответственно.

Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого разрешения (ВЭЖХ-УФ-МС-ВР) индивидуальных соединений из корней *M. amurensis* проводили на хроматомасс-спектрометре Shimadzu LCMS-IT-TOF (Япония), оснащенном жидкостным хроматографом высокого давления LC-20А, детектором на диодной матрице SPD-M20А и времяпролетным масс-спектрометром с ионной ловушкой. Разделение компонентов смесей выполняли на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, Agilent, США) с размером частиц 3,5 мкм, термостатированной при 40 °С. УФ-спектры записывали в диапазоне длин волн (λ) от 200 до 800 нм.

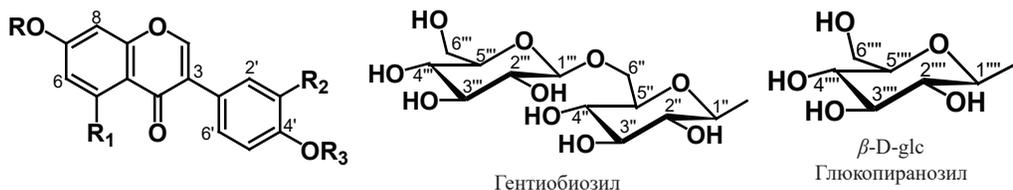
Подвижная фаза состояла из растворов муравьиной кислоты (0,1 %) в деионизированной воде (А) и ацетонитриле (Б). Градиентное элюирование осуществляли со скоростью потока растворителей 0,2 мл/мин по следующей схеме: 5 % Б (5 мин), 5–40 % Б (45 мин), 40–95 % Б (65 мин), 95 % Б (80 мин). Масс-спектрометрические данные получали в режиме ионизации электрораспылением и одновременной регистрации отрицательных и положительных ионов с разрешением 12 000. Диапазон регистрируемых значений m/z составил 200–1000, давление газа-осушителя (N_2) – 150 кПа, поток газа распылителя – 1,5 л/мин, потенциал ионного источника – 3,8 кВ при регистрации положительных и 4,5 кВ – отрицательных ионов.

12,3 г сухого спиртового экстракта из коры корней *M. amurensis* дважды хроматографировали на колонке, заполненной сорбентом «Полихром» в воде. В результате получили суммарную фракцию полярных соединений (2,0 г), содержащую до 20 % свободных углеводов. Водные фракции анализировали методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-УФ-МС-ВР. Фракции, содержащие гликозиды изофлавонов, повторно хроматографировали на полихrome. Хроматография суммы водорастворимых гликозидов на сорбенте Toyopearl HW-50С в воде дала семь изофлавоноидов с выходом 3,8, 5,3, 8,8, 10,5, 26,0, 6,6 и 6,8 мг.

Результаты

Мы продолжили изучение химического состава суммарного спиртового экстракта из коры корней *M. amurensis*. Целью этой работы было выделение и установление строения наиболее полярных, растворимых в воде конъюгированных форм изофлавоноидов. Суммарный спиртовый экстракт, кроме гликозидов изофлавонов, содержал до 15 % углеводов (в основном D-глюкозы), а также ксилозы, фруктозы и сахарозы, что существенно затрудняло выделение и идентификацию изофлавоноидов. Многократной хроматографией на сорбенте «Полихром» суммарная фракция гликозидов изофлавонов была

отделена от мономерных и олигомерных сахаров. Из этой фракции хроматографией на сорбенте Тоуорепарл HW-50С были получены в индивидуальном состоянии семь гликозидов изофлавонов, из которых пять (1, 2, 4, 6, 7) оказались новыми соединениями, а два (3, 5) – впервые выделенными из *M. amurensis* (см. рисунок).



	R	R ₁	R ₂	R ₃
1	β -D-glc	H	H	Гентиобиозил
2	Гентиобиозил	H	H	β -D-glc
3	β -D-glc	H	H	β -D-glc
4	Гентиобиозил	ОН	H	β -D-glc
5	β -D-glc	ОН	H	β -D-glc
6	Гентиобиозил	H	OCH ₃	H
7	Гентиобиозил	H	ОН	CH ₃

Структуры гликозидов из коры корней *M. amurensis*

В дополнение к 12 гликозидам изофлавонов и птерокарпанов мы выделили еще 7 изофлавоноидов, которые представлены диглюкозидами даидзеина (3), генистеина (5), гентибиозидами 3'-метоксидаидзеина (6) и каликозина (7), тригликозидами даидзеина (1, 2) и генистеина (4).

Структуры новых соединений были установлены как 4'-O-гентибиозид даидзина (1), 4'-O- β -D-глюкопиранозид 7-O-гентибиозилдаидзеина (2), 4'-O- β -D-глюкопиранозид 7-O-гентибиозилгенистеина (4), 7-O-гентибиозид 3'-метоксидаидзеина (6) и 7-O-гентибиозид каликозина (7). Соединения 3 и 5 на основании спектральных данных были идентифицированы как 4'-O- β -D-глюкопиранозид даидзина и 4'-O- β -D-глюкопиранозид генистеина. Эти гликозиды ранее были выделены из клеточной культуры *M. amurensis* [16].

Заключение

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородова Э.И., Венгеровский А.И., Гайсаев Р.О., Саратиков А.С., Федорев С.А. Новое гепатозащитное средство – Максар // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 1999. Т. 8. С. 46–48.
2. Гайсаев Р.О., Белобородова Э.И., Саратиков А.С. Способ лечения хронических гепатитов: пат. 2175237 РФ. Заявл. 02.06.1998; опубл. 27.10.2001, Бюл. № 30.
3. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Момот А.П., Талалаева О.С., Кулеш Н.И., Федорев С.А., Лычева Н.А. Влияние 7-O-гентибиозида формонетина на показатели коагуляционного гемостаза и фибринолиза у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2016. Т. 67. С. 73–76.

4. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Момот А.П., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Кулеш Н.И., Федорев С.А., Лычева Н.А. Влияние 7-О-гентиобиозида формонетина на показатели тромбоцитарного гемостаза у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2016. Т. 66. С. 55–58.
5. Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Кулеш Н.И., Федорев С.А. Средство, обладающее антиагрегантной и антикоагулянтной активностью: пат. 2573379 РФ. Заявл. 12.08.2014; опубл. 20.01.2016, Бюл. № 2.
6. Зверев Я.Ф., Кудинов А.В., Момот А.П., Федорев С.А., Замятина С.В., Кулеш Н.И., Лычева Н.А., Федоров Д.В. Антиагрегантная и антикоагулянтная активность 7-О-гентиобиозида формонетина в условиях *in vitro* и *in vivo* // Бюл. сиб. медицины. 2016. Т. 15. С. 30–39.
7. Зверев Я.Ф., Федорев С.А., Кудинов А.В., Тарбеева Д.В., Кулеш Н.И., Григорчук В.П., Замятина С.В. Особенности фармакокинетики 7-О-гентиобиозида формонетина определяют его гемостатическую активность у крыс // Тромбоз, гемостаз и реология. 2018. Т. 74. С. 78–87.
8. Кулеш Н.И., Федорев С.А., Веселова М.В., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Влияние изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50. С. 21–27.
9. Кулеш Н.И., Федорев С.А., Веселова М.В., Мищенко Н.П., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е. Гепатопротективное средство: пат. 2454243 РФ. Заявл. 14.02.2011; опубл. 27.06.2012, Бюл. № 18.
10. Кулеш Н.И., Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Федорев С.А., Веселова М.В., Мищенко Н.П. Средство, обладающее антиагрегантной и антикоагулянтной активностью: пат. 2601407 РФ. Заявл. 08.09.2015; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 31.
11. Кушнерова Н.Ф., Федорев С.А., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Веселова М.В., Момот Т.В. Гепатопротекторные свойства изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* при экспериментальном поражении печени четыреххлористым углеродом // Эксперим. и клинич. фармакол. 2014. Т. 77. С. 26–30.
12. Плотникова А.М., Шульгау З.Т., Плотникова Т.М., Алиев О.И., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Федорев С.А. Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность экстракта из древесины мааки амурской // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 147. С. 164–167.
13. Плотникова А.М., Плотникова Т.М., Шульгау З.Т., Федорев С.А., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П., Василевская Н.А., Имбс Т.И., Глебо Л.И. Средство, обладающее гемореологической и антитромбоцитарной активностью: пат. 2342944 РФ. Заявл. 06.06.2007; опубл. 10.01.2009, Бюл. № 1.
14. Федорев С.А., Кулеш Н.И., Глебо Л.И., Покушалова Т.В., Веселова М.В., Саратиков А.С., Венгерский А.И., Чучалин В.С. Препарат Максар из дальневосточного растения мааки амурской // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. С. 22–26.
15. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Федорев С.А. Корни мааки амурской – перспективный источник для создания гепатопротекторных препаратов // Фундам. исслед. 2014. Т. 5. С. 1225–1228.
16. Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P., Grishchenko O.V., Veselova M.V., Krivoschekova O.E., Kulesh N.I., Denisenko V.A., Tchernoded G.K., Zhuravlev Y.N. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56. P. 7023–7031.
17. Kulesh N.I., Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Zverev Ya.F., Zamyatina S.V. Antioxidant activity of the isoflavonoids from the roots of *Maackia amurensis* // Nat. Prod. Comm. 2013. Vol. 8. P. 589–592.
18. Pyo Y.-H., Lee T.-C., Lee Y.-C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with b-glucosidase-producing lactic acid bacteria // Food Res. Int. 2005. Vol. 38. P. 551–559.
19. Shelnut S.R., Cimino C.O., Wiggins P.A., Ronis M.J.J., Badger T.M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage // Amer. J. Clin. Nutr. 2002. Vol. 76. P. 588–594.
20. Veitch N.C. Isoflavonoids of the leguminosae // Nat. Prod. Rep. 2013. Vol. 30. P. 988–1027.

Е.В. ЛЕЩЕНКО, Е.В. ИВАНЕЦ, М.П. СОБОЛЕВСКАЯ

Вторичные метаболиты грибов-микромикетов морских растений

*Из четырех изолятов факультативных морских грибов рода *Penicillium* (*P. thomii* KMM 4667, *P. thomii* Maire KMM 4675, *P. thomii* KMM 4674 и *P. sp.* KMM 4672), ассоциированных с морскими растениями, выделено 30 новых вторичных метаболитов различной химической природы. Структуры соединений установлены на основе данных ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. Абсолютные конфигурации ряда соединений определены с помощью вычислений спектров электронного кругового дихроизма (ECD) в рамках нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) и сравнения КД-спектров с литературными данными, а также с помощью метода Мошера. Исследована цитотоксическая и противовоспалительная активность ряда выделенных соединений.*

Ключевые слова: морские грибы, вторичные метаболиты, поликетиды, сесквитерпены, цитотоксическая активность, противовоспалительная активность.

Secondary metabolites of micromycetes fungi of marine plants. E.V. LESHCHENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Far Eastern Federal University, Vladivostok), E.V. IVANETS, M.P. SOBOLEVSKAYA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*Thirty new secondary metabolites of various chemical nature were isolated from marine fungi of the genus *Penicillium*: *P. thomii* KMM 4667, *P. thomii* Maire KMM 4675, *P. thomii* KMM 4674 and *Penicillium sp.* KMM 4672, associated with the marine plants. The structures of the compounds were established based on NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. The absolute configurations of several compounds were determined using the Mosher's method and by time-dependent density functional theory (TD-DFT) calculation of ECD spectra and comparison of these spectra with published data. The cytotoxic and anti-inflammatory activity of a number of isolated compounds was examined.*

Key words: marine fungi, secondary metabolites, polyketides, sesquiterpenes, cytotoxic activity, anti-inflammatory activity.

Введение

Интенсивные исследования наземных микроорганизмов, продуцирующих биологически активные соединения, были начаты в середине прошлого века и продолжают в настоящее время. В то же время число новых метаболитов, продуцируемых ими, снижается, так как около 90 % культур синтезируют уже известные соединения. Поэтому закономерен интерес к изучению метаболитов микроорганизмов из других биологических сообществ, в том числе из морских. Активное изучение грибов-микромикетов из морских источников как продуцентов биологически активных соединений началось в начале 2000-х годов.

Анализ литературных данных показывает, что значительное число новых биологически активных метаболитов морских грибов выделены из грибов, ассоциированных

ЛЕЩЕНКО Елена Владиславовна – младший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), научный сотрудник (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), ИВАНЕЦ Елена Валерьевна – младший научный сотрудник, *СОБОЛЕВСКАЯ Мария Павловна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: afiyat@piboc.dvo.ru

с морскими водорослями и травами [13]. Грибы морских водорослей и трав, имеющие биологически активные вторичные метаболиты, играют важную роль в химической защите организма хозяина от растительноядных животных, подводных насекомых и патогенных микроорганизмов [9]. В то же время грибы морских водорослей и трав дальневосточных морей до сих пор остаются малоисследованными.

Заметные антибиотические свойства проявляют многие метаболиты из грибов морских водорослей. Так, хлорированный бензофенон – песталон из гриба *Pestalotia* sp., выделенного из бурой водоросли *Rosenvingea* sp., и цереброзиды – флавуциды А и В, выделенные из гриба *Aspergillus flavus*, ассоциированного с зеленой водорослью *Codium fragile*, обнаруживают высокую активность в отношении клинических изолятов метициллин- и мультилекарственно-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* [4, 16]. Антифунгальную и антибактериальную активность в отношении культур *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Colletotrichum lagenarium* и *Fusarium oxysporum* проявляют ксантоновые производные – уйказины В и С из гриба *A. wentii*, выделенного из красной водоросли *Gymnogongrus flabelliformis* [15].

Мощной антипротозойной активностью обладают необычные нерегулярные терпеноиды из гриба *Drechslera dematioidea*, выделенного из водоросли *Liagora viscida*, макролид – айгиаломицин D из водорослевого гриба *Aigialus parvus* ВСС 5311, производное тетрамовой кислоты – аскосалипираллидин А из облигатного гриба *Ascochyta alicorniae*, ассоциированного с зеленой водорослью *Ulva* sp. [7, 11, 12].

Ряд метаболитов различных химических классов из грибов морских водорослей и трав рассматриваются в настоящее время в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов [3, 5]. Среди них ингибитор формирования тубулиновых микротрубочек дикетопиперазинплинабулин из гриба *Aspergillus* sp. CNC-139, ассоциированного с морской водорослью [3] (фаза II клинических испытаний), лептозин А и сансалваמיד – ингибиторы топоизомеразы II из грибов *Leptosphaeria* sp. и *Fusarium* sp., выделенных из морской травы *Halodule wrightii* [6].

В этой обзорной статье мы обсуждаем сведения о структурах и свойствах некоторых метаболитов из морских изолятов грибов, изученных в лаборатории химии микробных метаболитов ТИБОХ ДВО РАН совместно с кафедрой биоорганической химии и биотехнологии Дальневосточного федерального университета. В работе использовались коллекция морских микроорганизмов и оборудование Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрия) ТИБОХ ДВО РАН.

Результаты и обсуждение

В ранее опубликованных работах мы описали выделение и идентификацию шести новых природных алкалоидов, карнехиназолинов А–С и карнеамидов А–С, двух новых арилгликозидов, карнемицинов А и В, нового дриманового сесквитерпеноида из морского гриба *Aspergillus carneus* КММ 4638, ассоциированного с бурой водорослью *Laminaria sachalinensis* (Miyabe) [7], десяти новых меротерпеноидов–аусталидов и семи новых 6,6-спирокеталей – саргассопениллинов А–G из грибов *P. thomii* КММ 4645 и *P. lividum* КММ 4663, ассоциированных с бурой водорослью *Sargassum miyabei* [18, 19].

Продолжая нашу работу по поиску новых биоактивных метаболитов из морских грибов, мы исследовали штамм *Penicillium thomii* КММ 4667, выделенный с поверхности ризома морской травы *Zostera marina* (Японское море) [1]. Гриб культивировали в течение 21 суток на специально модифицированной рисовой среде. Мицелий гриба со средой экстрагировали этилацетатом. Сухой экстракт растворяли в системе этанол–вода (1 : 4) и последовательно экстрагировали гексаном и этилацетатом. Этилацетатный экстракт хроматографировали последовательно на колонке с силикагелем и методом обращенно-фазной ВЭЖХ. В результате были получены сесквитерпены зудесманового типа – томимарины А–D (1–4) (рис. 1).

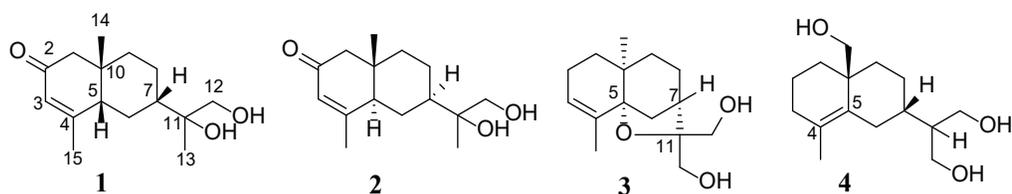


Рис. 1. Структуры томимаринов А–D (1–4)

Молекулярная формула соединения **1** была определена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании данных масс-спектрометрии высокого разрешения HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 275.1623) и ^{13}C ЯМР-анализа. Анализ двумерных ЯМР-спектров **1** показал присутствие в структуре молекулы циклогексен-2-еновой системы, метильных групп при С-4 и С-10 и 1,2-дигидроксипропильного остатка при С-7 в качестве боковой цепи. Относительная конфигурация соединения **1** была определена с помощью NOESY эксперимента.

Абсолютная стереохимия **1** установлена при сравнении экспериментальных и теоретически вычисленных КД-спектров. Для получения статистически усредненных спектров были выбраны стабильные конформации **1** в соответствии с их свободными энергиями Гиббса. В результате вычислены и статистически усреднены индивидуальные КД-спектры для десяти конформаций со стереохимией *5S*, *7S*, *10S*, *11S* и для двенадцати конформаций с иной стереохимией – *5S*, *7S*, *10S*, *11R*. Сравнение теоретических спектров с экспериментальным (рис. 2) показало, что все спектры качественно подобны в области $\lambda \leq 280$ nm, где наблюдаются значительные эффекты Коттона. Конфигурация асимметрического центра при С-11 в соединении **1** не была установлена. Таким образом, абсолютные конфигурации других стереоцентров **1** были определены как *5S*, *7S*, *10S*. Соединение получило название томимарин А.

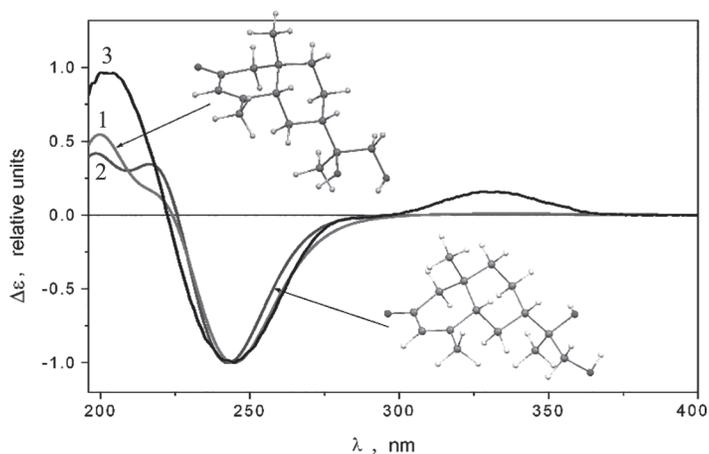


Рис. 2. КД-спектры томимарина А (1): 1 – рассчитанные для *5S*, *7S*, *10S*, *11S*; 2 – рассчитанные для *5S*, *7S*, *10S*, *11R*; 3 – полученные экспериментально

Молекулярная формула соединения **2** определена на основании пика $[M+H]^+$ (m/z 253.1816) в APPI-MS и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. ЯМР-спектры соединения **2** были близки к соответствующим спектрам томимарина А (**1**), за исключением сигналов Н-5 и С-5, С-7 и С-9. COSY и HMBC корреляции устанавливали структуру колец А и В и показали присутствие 1,2-дигидроксипропильного остатка в боковой цепи **2**. Абсолютная стереохимия **2** была установлена так же, как и для томимарина А. КД-спектры для семи конформаций со стереохимией *5R*, *7S*, *10S*, *11R* и двенадцати конформаций иной альтернативной стереохимии (*5R*, *7S*, *10S*, *11S*) были вычислены и статистически

усреднены. Таким образом, абсолютная конфигурация стереоцентров **2** установлена как *5R, 7S, 10S*. Соединение названо томимарином В.

Молекулярная формула соединения **3** была установлена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании данных HRESIMS спектра m/z 275.1621 $[M+Na]^+$ и ^{13}C ЯМР анализа. Сигналы ^{13}C ЯМР-спектра **3** были практически идентичны сигналам для известного соединения α -агарофурана [8], за исключением сигналов C-7 и C-11–C-13. HMBC корреляции свидетельствовали о присутствии двух гидроксиметиленовых групп при C-11. Абсолютная структура соединения **3** была доказана с помощью методов КД-спектроскопии. Сравнение статистически усредненных теоретических КД-спектров (девять более стабильных конформеров) стереоизомера *5S, 7S, 10S* с экспериментальным спектром показало, что оба спектра качественно подобны в области $195 \leq \lambda \leq 240$ нм, где наблюдаются характеристические эффекты Коттона. Таким образом, абсолютная структура соединения **3** была установлена как *5S, 7S, 10S*. Соединение получило название томимарин С.

Молекулярная формула соединения **4** была установлена как $C_{15}H_{26}O_3$ (m/z 277.1780) $[M+Na]^+$ на основании HRESIMS и ^{13}C ЯМР анализа. Корреляции, наблюдаемые в COSY, HSQC и HMBC спектрах **4**, показали наличие циклогексенового кольца (A), положение метильной и гидроксиметильной групп при C-4 и C-10 установили соответственно структуру кольца B и пропан-1,3-диольного остатка при C-7. Сравнение статистически усредненных теоретических КД-спектров стереоизомера *7S, 10S* с экспериментальным КД показало, что оба спектра качественно подобны, и, таким образом, абсолютная структура соединения **4** была установлена как *7S, 10S, 11S*. Соединение получило наименование томимарин D.

Было показано, что соединения **1, 2** и **4** при концентрации $10,0 \mu M$ индуцируют значительное снижение продукции NO в ЛПС-стимулированных макрофагах. Уровень NO в этих клетках был снижен на $24,9 \pm 0,9 \%$ ($p < 0,01$), $43,4 \pm 1,5 \%$ ($p < 0,01$) и $20,9 \pm 5,7 \%$ ($p < 0,05$) соответственно в сравнении с контрольными клетками, стимулированными липополисахаридом. Томимарин В показал максимальное ингибирование NO в ЛПС-стимулированных RAW 264.7 клетках.

Из этилацетатного экстракта культуры гриба *Penicillium thomii* Maire KMM 4675, ассоциированного с бурой водорослью *Sargassum pallidum*, были выделены 11 новых метаболитов поликетидного биогенеза – паллидопениллинов **5–15** (рис. 3) [14].

HRESIMS соединения **5** содержит пик m/z 291.1582 $[M+Na]^+$. Молекулярную формулу соединения **5** установили как $C_{15}H_{24}O_4$ на основании данных масс-спектрометрии высокого разрешения и спектра ЯМР ^{13}C . Анализ спектров ЯМР 1H и ^{13}C , DEPT, HSQC, COSY и HMBC показал наличие в данном соединении декалиновой скелетной системы, Δ^{11} двойной связи, метильных групп при C-4, C-8 и C-13, гидроксильных групп при C-9 и C-13, а также присутствие 3-гидрокси-1-оксипропильного остатка в качестве боковой цепи.

Молекулярная структура и относительная конфигурация соединения **5** были подтверждены данными рентгеноструктурного анализа монокристалла, полученного при кристаллизации в этаноле. Абсолютная конфигурация была установлена методом Мошера и на основании NOESY взаимодействий. Так, этерификация соединения **5** с (*R*)- и (*S*)-МТРА хлорангидридами привела к образованию (*S*)- и (*R*) МТРА эфиров **5a** и **5b** соответственно. Разница химических сдвигов $\Delta\delta(\delta_S - \delta_R)$ в протонных спектрах полученных эфиров указывала на *9R* конфигурацию, что позволило нам установить конфигурацию асимметрических центров соединения **5** как *4R, 5S, 8S, 9R, 10R, 13R*. Соединение **5** было названо паллидопениллином А.

Для соединения **6** молекулярная формула $C_{17}H_{26}O_5$ установлена на основании значений пиков квазимолекулярных ионов m/z 333.1678 $[M+Na]^+$, полученных при HRESIMS. Данные 1H и ^{13}C ЯМР-спектров соединения **6** показали присутствие ацетокси группы при C-1 вместо гидроксильной группы в соединении **5**. Абсолютная конфигурация соединения **6** как *4R, 5S, 8S, 9R, 10R, 13R* была установлена на основании КД-спектроскопии. Соединение **6** получило наименование 1-ацетил-паллидопениллин А.

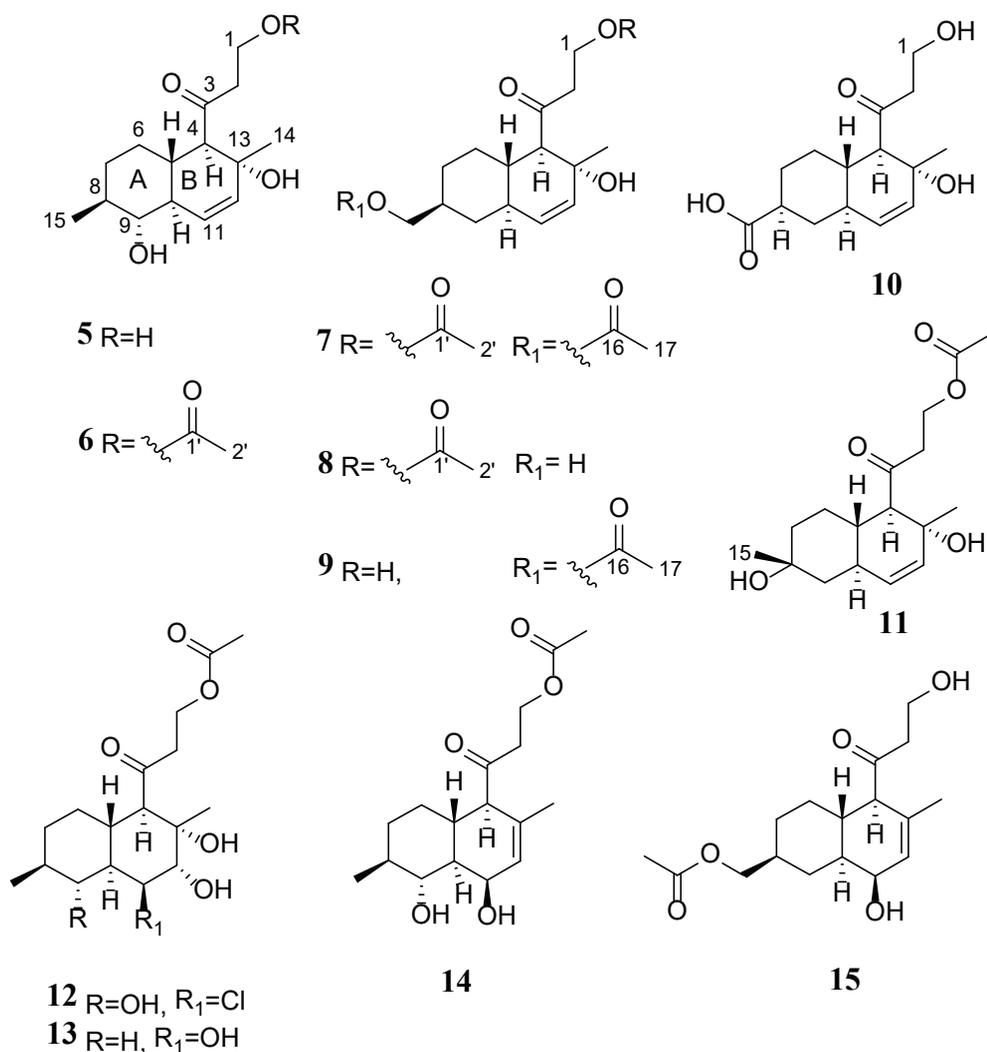


Рис. 3. Метаболиты гриба *Penicillium thomii* KMM 4675

Молекулярная формула соединения **7** установлена как $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$ на основании HRESIMS и данных ^{13}C ЯМР-спектра. Данные спектров ЯМР ^1H и ^{13}C соединения **7** показали, что в структуре кольца А отсутствует гидроксильная группа в положении С-9 и присутствует ацетоксиметильная группа в положении С-8. NOESY взаимодействия Н-4/Н-10, ОН-13; Н-5/Н₃-14; Н-8/Н-10 указывали на *trans*-сочленение колец А и В, β -ориентацию метильной группы в положении С-14 и ацетоксиметильной группы при С-8, а также на α -ориентацию гидроксильной группы при С-13. Абсолютная конфигурация соединения **7** установлена методом КД-спектроскопии как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Соединение **7** получило название паллидопениллин В.

Молекулярная формула соединения **8** установлена как $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Данные ЯМР ^1H и ^{13}C спектров этого соединения совпадают с данными ЯМР-спектров для паллидопениллина В (**7**), за исключением сигналов протонов и углеродов при С-8 и С-15. Эти данные и разница в 42 Да между молекулярными массами соединений **7** и **8** указывают на присутствие гидроксиметильной группы при С-8 в соединении **8**. Соединение имеет характерные эффекты Коттона при $\lambda_{192} +0,26$, $\lambda_{204} -0,72$, $\lambda_{294} -0,85$ в КД-спектре, записанном в гексане. Эти данные хорошо соответствуют данным

для соединений **6** и **7**, за исключением полосы поглощения низкой интенсивности, соответствующей положительному эффекту Коттона в области $215 \leq \lambda \leq 250$ нм. В результате абсолютная конфигурация соединения **8** была установлена как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Данное соединение названо 15-деацетил-паллидопениллином В.

Молекулярная формула соединения **9** установлена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании данных HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Структура соединения и положение 3-гидрокси-1-оксипропильной группы при С-4 определены на основании HMBC и COSY взаимодействий также, как и для соединения **5**. В КД-спектре соединения **9** в гексане наблюдали эффекты Коттона при $\lambda_{192} +0,46$, $\lambda_{204} -0,15$, $\lambda_{294} -0,25$, которые находились в хорошем соответствии с эффектами Коттона, наблюдаемыми для **6**, **7** и **8**. Эти данные позволили установить абсолютную конфигурацию **9** как *4R, 5S, 8S, 10R, 13R*. Соединение получило название 1-деацетилпаллидопениллин В.

На основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C данных молекулярная формула соединения **10** установлена как $C_{15}H_{22}O_5$, ЯМР-спектральные данные для него соответствуют данным, полученным для **9**, за исключением сигналов протонов и углерода при С-8. HMBC корреляции показали присутствие в соединении **10** карбоксильной группы в положении С-8. Относительная конфигурация была определена на основании NOESY взаимодействий. Соединение было названо паллидопениллином С.

Молекулярная формула соединения **11** установлена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании данных HRESIMS и ЯМР ^{13}C спектров. ЯМР-спектры данного соединения близко соответствовали спектрам паллидопениллина В (**7**), за исключением С-6–С-10 протонных и углеродных сигналов. HMBC взаимодействия Н-9 (δ_H 1.56)/С-8 (δ_C 67.7), С-10 (δ_C 36.4); Н₃-15 (δ_H 1.07)/С-7 (δ_C 38.4), С-8, С-9 (δ_C 44.6) позволили установить структуру соединения **11** с гидроксильной и метильной группами в положении С-8. Относительная конфигурация **11** определена на основании наблюдаемых NOESY взаимодействий. Соединение было названо паллидопениллином D.

Молекулярная формула соединения **12** установлена как $C_{17}H_{27}ClO_6$ на основании пиков квазимолекулярных ионов $[M-H]^-$ при m/z 361.1427 и $[M+Cl]^-$ при m/z 397.1179 в HRESIMS и была подтверждена данными ЯМР ^{13}C . Интенсивность изотопных пиков М+2 указывала на присутствие атома хлора. HMBC взаимодействия позволили установить структуру кольца А и присутствие 3-ацетокси-1-оксипропильного фрагмента в положении С-4, как и в 1-ацетил-паллидопениллине А. Путем анализа констант спин-спинового взаимодействия Н-11 и Н-12, химических сдвигов С-11 (δ_C 61.4) и С-12 (δ_C 76.9) и HMBC взаимодействия определена структура кольца В, включая положение атома хлора при С-11, метильной и гидроксильной групп при С-13, а также гидроксильной группы при С-12. Наблюдаемые NOESY корреляции указали на *trans*-сочленение колец А и В, β -ориентацию атома хлора и метильных групп при С-14 и С-15 и на α -ориентацию ОН-9, ОН-12 и ОН-13. Соединение **12** получило название паллидопениллин Е.

Молекулярная формула **13** установлена как $C_{17}H_{28}O_6$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Корреляции, наблюдаемые в COSY и HMBC спектрах, позволили выявить строение колец А и В, положение метильных групп при С-8, С-13 и гидроксильных групп при С-11, С-12 и С-13. Структура и положение 3-ацетокси-1-оксипропильного остатка в положении С-4 в соединении **13** установлены на основании HMBC и COSY взаимодействий также как и в паллидопениллине Е. Относительные конфигурации С-4, С-5, С-8, С-10, С-11, С-12 и С-13 ассиметрических центров в соединении **13** идентичны конфигурациям ассиметрических центров в соединении **12**, что следует из анализа NOESY спектра. Соединение **13** было названо паллидопениллином F.

Молекулярная формула соединения **14** была определена как $C_{17}H_{26}O_5$ на основании HRESIMS и ЯМР ^{13}C . Структура кольца А и 3-ацетокси-1-оксипропильного фрагмента установлены также, как и для паллидопениллина Е. Данные COSY-45 и HMBC спектров позволили определить структуру кольца В, включая двойную связь при С-12, С-13 и положение гидроксильной и метильной групп при С-11 и С-13. Относительная конфигурация

соединения **14** выявлена на основании NOESY взаимодействий H-5/H-9, H₃-14; H-4/H-10 и H-8/H-10. Соединение **14** было названо паллидопениллином G.

Молекулярная формула соединения **15** идентифицирована как C₁₇H₂₆O₅ на основании HRESIMS и ЯМР ¹³C. Структура кольца B и боковая цепь были установлены как и для паллидопениллина G. HMBC корреляции позволили определить структуру кольца A и положение ацетоксиметильной группы при C-8. Относительная конфигурация была установлена на основании NOESY корреляций. Соединение названо паллидопениллином H.

Соединения **5**, **9**, **11–13** были протестированы на цитотоксическую активность в отношении трех линий опухолевых клеток рака простаты человека 22Rv1, PC-3 и LNCaP. Паллидопениллин G (**14**) обнаружил активность в отношении 22Rv1 клеточных линий с ИК₅₀ 9,8 мкМ. Изучено действие паллидопениллинов на формирование и рост клеточной колонии 22Rv1 методом мягкого агара. Показано, что паллидопениллин G и 1-ацетилпаллидопениллин A ингибируют рост колонии этих клеток на 40 % в концентрациях 1 и 2 мкМ соответственно. Таким образом, его можно рассматривать в качестве перспективного канцер-превентивного агента.

15-деацетилпаллидопениллин B (**8**), паллидопениллин E (**12**) и паллидопениллин G (**14**) при концентрации 10 мкМ индуцируют достоверное снижение образования активной формы кислорода в макрофагах (АФК), стимулированных ЛПС. Уровень АФК уменьшился на 27 ± 1 (*p* < 0,01), 37 ± 3 (*p* < 0,01) и 36 ± 2 % (*p* < 0,01) соответственно по сравнению с контролем (клетками, обработанными ЛПС). Эти данные указывают на потенциальные иммуномодулирующие свойства изученных веществ.

Из липофильного экстракта штамма *P. thomii* КММ 4674, изолированного из микобактерии ризома морской травы *Z. marina*, были выделены 12 новых поликетидных метаболитов декалинового ряда – зостеропениллинов A–L (**16–27**) (рис. 4) [2].

Молекулярная формула соединения **16** установлена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1461) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. COSY и HMBC спектры соединения **16** показали присутствие декалинового фрагмента в структуре молекулы, положение двойной связи при C-11, C-12 и метильных групп при C-8 и C-13. HMBC взаимодействия H-1a (δ_H 4.11)/C-2 (δ_C 39.9), C-3 (δ_C 210.2) и C-13; H-2a (δ_H 2.64)/C-1 (δ_C 60.9), C-3; H-2b (δ_H 2.21)/C-3, C-4 свидетельствуют о наличии γ-пиронового фрагмента в соединении **16**. Относительная конфигурация соединения была установлена на основании анализа NOESY спектра подтверждена рентгеноструктурным анализом кристалла, полученного из смеси ацетонитрил–вода.

Абсолютная конфигурация **16** с помощью модифицированного метода Мошера определена как 4*R*, 5*S*, 8*R*, 9*R*, 10*R*, 13*S* (рис. 5). Соединение **16** было названо зостеропениллином A.

Молекулярная формула соединения **17** установлена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1474) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. Сигналы ¹³C ЯМР-спектра соединения оказались очень близки соответствующим сигналам зостеропениллина A, за исключением сигналов C-9–C-11 и C-15 углеродных атомов в кольце A. COSY и HMBC корреляции в спектрах **17** позволили установить структуру кольца A, положение гидроксильной группы при C-9 и гидроксиметильной группы при C-8. Данные NOESY спектра указывали на транс-сочленение колец A и B, дис-сочленение колец B и C, а также на β-ориентацию гидроксиметильной группы при C-8. Соединение **17** получило наименование зостеропениллин B.

Молекулярная формула соединения **18** определена как C₁₅H₂₂O₃ на основании данных HRESIMS [M+Na]⁺ (*m/z* 273.1461) и подтверждена данными ¹³C ЯМР-спектра. Сигналы углеродных атомов для соединения **18** оказались близки соответствующим сигналам зостеропениллина B, за исключением сигналов C-6–C-10 и C-15 атомов в кольце A. Детальный анализ ¹H, ¹³C ЯМР и HMBC спектров позволил установить структуру соединения **18**, включая гидроксильную и метильную группы при C-8. Относительная конфигурация

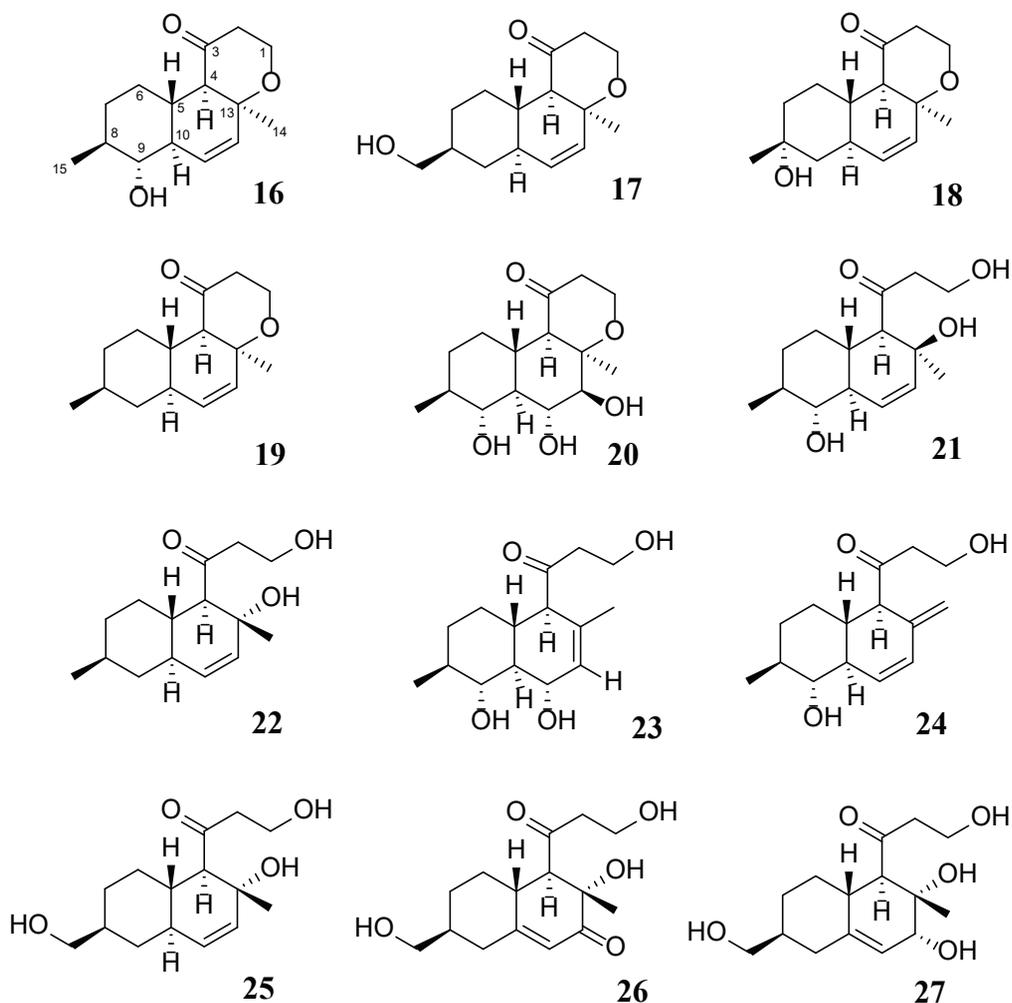


Рис. 4. Структуры зостеропениллинов А–L (16–27)

выявлена на основании NOESY взаимодействий. Соединение было названо зостеропениллином С.

Молекулярная формула соединения **19** установлена как $C_{15}H_{22}O_2$ на основании данных HRESIMS (m/z 257.1510 $[M+Na]^+$) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы водородных и углеродных атомов в спектрах **19** были близки соответствующим сигналам зостеропениллина В, за исключением сигналов С-7–С-9 и С-15. Взаимные HMBC корреляции $H_3-15/C-7$ и С-9 позволили установить структуру кольца А и положение метильной группы при С-8. Соединение **19** было названо зостеропениллином D.

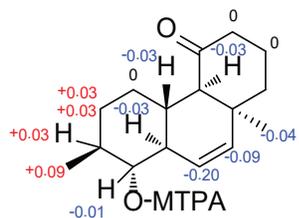


Рис. 5. $\Delta\delta$ ($\delta_s - \delta_r$) уровни химических сдвигов (в м.д.) для S (**16a**) и R-MTPA эфиров (**16b**)

Сравнение теоретических статистически усредненных КД-спектров соединений **16–19** с соответствующими экспериментальными спектрами показало, что все спектры качественно подобны в области $\lambda \geq 200$ нм, где наблюдались выраженные эффекты Коттона. Таким образом, абсолютные конфигурации были определены как 4R, 5S, 8S, 9R, 10R, 13S для **16**; 4R, 5S, 8S, 10R, 13S – для **17**; 4R, 5S, 8R, 10R, 13S – для **18**; 4R, 5S, 8S, 10R, 13S – для **19**.

Молекулярная формула соединения **20** определена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 283.1538 $[M-H]^-$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. По данным COSY спектров и наблюдаемым корреляциям в HMBC спектре установили присутствие декалиновой системы, насыщенного γ -пиронового фрагмента в соединении **20** и положение метильных групп при C-8 и C-13 и гидроксильных групп при C-9, C-11 и C-12. Относительная конфигурация соединения определена на основании данных NOESY спектра и анализа констант спин-спинового взаимодействия (KCCSB). Наблюдаемые NOESY корреляции и значение вицинальных констант спин-спинового взаимодействия между H-4 и H-5; H-5 и H-10; H-9 и H-10; H-10 и H-11; H-11 и H-12 указывают на транс-сочленение колец A и B, цис-сочленение колец B и C, α -ориентацию H_3 -14, 9-OH, 11-OH групп и β -ориентацию H_3 -15 и 12-OH групп. Соединение **20** названо зостеропениллином E.

Молекулярная формула **21** идентифицирована как $C_{15}H_{24}O_4$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 291.1579 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. Сигналы углеродных атомов в спектре этого соединения близки соответствующим сигналам в спектрах зостеропениллина A, за исключением сигналов C-1–C-3, C-13 и C-14. Структура декалинового фрагмента и положение метильных групп при C-8 и C-13 и кислородных функций при C-9 и C-13 установлены с помощью COSY и HMBC корреляций также, как и для **16**. COSY и HMBC корреляции указывают на присутствие 3-гидрокси-1-оксипропильного остатка при C-4. Относительная конфигурация **21** определена в результате NOESY эксперимента и анализа KCCSB. Соединение **21** получило наименование зостеропениллин F.

Молекулярная формула соединения **22** установлена как $C_{15}H_{24}O_3$ на основании пика псевдомолекулярного иона с m/z 275.1621 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и подтверждена ^{13}C ЯМР анализом. Сигналы углеродных атомов в спектре **22** оказались близки соответствующим сигналам в спектре зостеропениллина D (**19**), за исключением сигналов C-1–C-3 и C-13, C-14. Структура декалиновой части, положение метильных групп при C-8 и C-13, кислородной функции при C-13 и 3-гидрокси-1-оксипропильного остатка при C-4 были определены на основании HMBC и COSY корреляций. Относительная конфигурация соединения **22** выявлена на основании данных NOESY эксперимента. Соединение **22** было названо зостеропениллином G.

Молекулярная формула соединения **23** установлена как $C_{15}H_{22}O_4$ на основании HRESIMS (m/z 291.1571) $[M+Na]^+$ и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Структуры 1-, 2-, 3-, 4-замещенного циклогексанового кольца и боковой цепи в **23** определены, как и для зостеропениллинов E (**20**) и F (**21**). Данные HMBC позволили установить структуру кольца B, положение двойной связи при C-12, C-13 и гидроксильной группы при C-11. Относительная конфигурация **23** была предложена на основании NOESY и KCCSB. Соединение получило название зостеропениллин H.

Молекулярная формула соединения **24** идентифицирована как $C_{15}H_{22}O_3$ на основании данных HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 273.1462) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Структуры кольца A и боковой цепи были установлены как для зостеропениллинов E (**20**) и F (**21**). Наблюдаемые COSY и HMBC корреляции указывали на присутствие диеновой системы при C-11 и C-13(14) в соединении **24**. Относительная конфигурация соединения была предложена на основании NOESY взаимодействий H-4/H-10; H-8 (δ_H 1.43)/H-10 и H-5 (δ_H 1.68)/H-9, H_3 -15 (δ_H 1.05). Соединение названо зостеропениллином I.

Молекулярная формула соединения **25** определена как $C_{15}H_{22}O_3$ с помощью HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 291.1573) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. Сигналы углеродных атомов в этом соединении практически совпадали с соответствующими сигналами в спектре соединения **22**, за исключением сигналов C-7–C-9 и C-15 атомов. Эти данные и разница в 16 массовых единиц между молекулярными массами соединений **22** и **25** свидетельствуют о присутствии гидроксиметильной группы при C-8 в **22** вместо метильной группы в соединении **25**. Наблюдаемые NOESY взаимодействия указывали на трансочленение

колец А и В, β -ориентацию боковой цепи, метильной группы при С-14 и гидроксиметильной группы при С-8. Соединение названо зостеропениллином J.

Молекулярная формула соединения **26** установлена как $C_{15}H_{22}O_5Na$ методом HRESIMS $[M+Na]^+$ (m/z 305.1370) и подтверждена данными ^{13}C ЯМР-спектра. В УФ-спектре данного соединения наблюдалась полоса поглощения при 242 нм, соответствующая еноновой хромофорной системе. Данные COSY и HMBC спектров позволили установить структуру колец А и В и указывали на 10-ен-12-он положение енонового хромофора в соединении **26**. Структура боковой цепи была установлена на основании ЯМР-спектроскопии, как для зостеропениллина F (**21**). Относительная конфигурация **26** была предложена на основании анализа данных NOESY спектра и КССВ. Соединение **26** получило название зостеропениллин К.

Молекулярная формула соединения **27** определена как $C_{15}H_{24}O_5$ на основании пика при m/z 307.1501 $[M+Na]^+$ в HRESIMS и ^{13}C NMR анализа. Структура кольца А в **27** была установлена также, как и для зостеропениллина К (**26**). Данные HMBC спектра соединения **27** позволили установить структуру кольца В, положение кислородных функций при С-12, С-13 и метильной группы при С-13. Относительная конфигурация соединения **27** выявлена на основании наблюдаемых NOESY корреляций H-5/H₃-14; H₃-14/H-12; H-4/H-6b; H-6b/H-8 и значения КССВ для H-4 (δ_H 3.09, $J = 10,0$ Hz). Соединение **27** было названо зостеропениллином L.

Было показано, что соединения **17**, **23** и **25** индуцировали в липополисахарид-индуцированных мышинных макрофагах RAW 264.7 снижение выработки оксида азота на 27, 21 и 22 % соответственно в нецитотоксической концентрации 10 мкМ. Мы исследовали эффект зостеропениллинов **16–18**, **22**, **23**, **25** и **26** на экспрессию белка p62, связанного с аутофагией. Анализ показал незначительное увеличение уровня p62 в клетках PC3, инкубированных с исследуемыми веществами. Эффект на экспрессию белка был схож с действием бафиломицина A1 (Baf), хорошо известного ингибитора аутофагии. Эти результаты показывают, что зостеропениллины способны ингибировать аутофагию в нецитотоксических концентрациях и могут повышать чувствительность клеток рака простаты человека для антиопухолевых препаратов.

В рамках продолжающегося поиска структурно новых биологически активных метаболитов из морских грибов, ассоциированных с морскими водорослями, мы исследовали гриб *Penicillium* sp. KMM 4672, выделенный из вьетнамской бурой водоросли *Padina* sp. в 38-м рейсе НИС «Академик Опарин». Химические исследования привели к получению и идентификации трех новых 1,2-оксазадекалиновых эпидитиодикетипиперазинов претриходермамидов D–F (**28–30**) совместно с известными претриходермидом С (**31**) и N-метилпретриходермамидом В (**32**) (рис. 6) [17].

Брутто-формула соединения **28** была определена как $C_{21}H_{24}N_2O_9S_2$ на основании псевдомолекулярного пика HRESIMS при m/z 511.0857 $[M-H]^-$, что соответствует данным ^{13}C ЯМР.

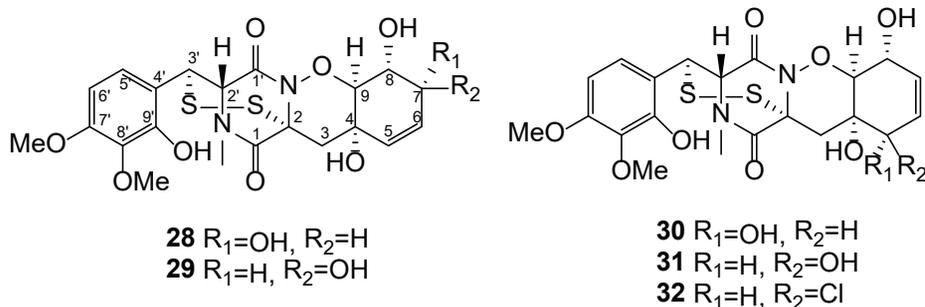


Рис. 6. Структуры соединений, выделенных из гриба *Penicillium* sp. KMM 4672

Прямое сравнение спектров ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **28** со спектрами претриходермамида **С** (**31**) [10] показало их сходство, включая сигналы двух метоксильных (δ_{H} 3.68, 3.78; δ_{C} 55.7, 60.2), одной *N*-метильной (δ_{H} 2.96; δ_{C} 32.6), одной фенольной гидроксильной (δ_{H} 9.43) групп, двух ароматических метинов (δ_{H} 6.55, 7.32; δ_{C} 103.3, 122.6) и двух амидных карбонильных групп (δ_{C} 164.2, 165.4), что говорит о близости углеродных скелетов соединений **28** и **31**.

Корреляции, наблюдаемые в НМВС спектре, позволили установить наличие в структуре молекулы циклогексенового кольца с двойной связью между С-5 и С-6. Положение вторичных гидроксильных групп при С-7 и С-8 было доказано НМВС взаимодействиями от 7-ОН (δ_{H} 4.89) к С-7 и от 8-ОН (δ_{H} 4.35) к С-8. Таким образом была установлена плоская структура соединения **28**.

Этерификация гидроксильных групп при С-7 и С-9' в соединении **28** (*R*)- и (*S*)-МТРА хлорангидридами привела к получению (*S*)- и (*R*)-ди-МТРА-эфиров соответственно. Разница химических сдвигов $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) указывает на 7*R* конфигурацию (рис. 7).

Абсолютные конфигурации остальных стереоцентров в циклогексеновом кольце были определены как 4*S*, 8*R*, 9*S*. Абсолютные конфигурации установлены на основании ROESY корреляций 7-ОН с Н-9 и Н-9 с 4-ОН и 8-ОН, а также значений КССВ $^3\text{J}_{\text{H8-H9}}$ (9,4 Гц) и $^3\text{J}_{\text{H7-H8}}$ (4,6 Гц), которые соответствуют расчетным диэдральным углам (177° и 46° соответственно). Абсолютные конфигурации при С-2, С-2' и С-3' были предложены такими же, как в известных адаметизине А (*N*-метилпретриходермамиде В) и адаметизине В (претриходермамиде С), на основании сходства химических сдвигов С-2, С-2' и С-3' для этих биогенетически родственных соединений. Соединение **28** было названо претриходермамидом D.

Брутто-формула соединения **29** определена как $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ (идентично соединению **28**) на основании пика HRESIMS при m/z 511.0869 $[\text{M}-\text{H}]^-$ и ^{13}C ЯМР анализа. Основные сигналы спектров ^1H и ^{13}C ЯМР соединения **29** соответствовали таковым в соединении **28**, за исключением протонных и углеродных сигналов С-7 и С-8. Корреляции, наблюдаемые в НМВС спектре, подтверждают, что «плоская» структура соединения **29** идентична «плоской» структуре претриходермамида D (**28**). Вицинальные КССВ $\text{J}_{\text{H7-H8}}$ (7,7 Гц) и $\text{J}_{\text{H8-H9}}$ (10,7 Гц) в соответствии с уравнением Карплуса (расчетные диэдральные углы 168° и 174° соответственно) указывают на аксиальное положение Н-7, Н-8 (δ_{H} 3.56) и Н-9. Эти относительные конфигурации были дополнительно подтверждены ROESY корреляциями Н-7 с 8-ОН (δ_{H} 4.64) и Н-9. Абсолютные конфигурации хиральных центров соединения **29** были предложены такими же, как в претриходермамиде D (**28**) в соответствии с биогенетическими соображениями. Таким образом, соединение **29** было определено как эписмерпретриходермамида D по С-7 и названо претриходермамидом E.

Брутто-формула соединения **30** установлена как $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ (идентично соединениям **28** и **29**) на основании данных HRESIMS и ^{13}C ЯМР. Данные ЯМР для этого соединения были очень близки к таковым для претриходермамида С (**31**), за исключением протонных и углеродных сигналов при С-3–С-6 и С-9. НМВС взаимодействия в спектре **30** подтверждают «плоскую» структуру циклогексенового кольца с двойной связью между С-6 и С-7. Взаимные ROESY корреляции Н-9 с 4-ОН (δ_{H} 4.96), 5-ОН (δ_{H} 5.19) и 8-ОН (δ_{H} 5.15) указывают на α -ориентацию 5-ОН и позволяют определить соединение **30** как С-5-эписмер претриходермамида С (**31**). Относительные конфигурации 1,2-оксазадекалинового фрагмента были дополнительно подтверждены константой взаимодействия W-типа между Н-9 (δ_{H} 3.97, дд, 7.3, 1.5) и Н-3 β (δ_{H} 2.06, дд, 15.4, 1.5). Абсолютные конфигурации

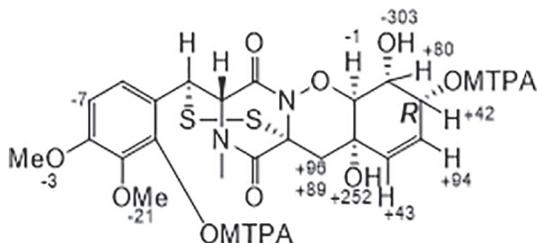


Рис. 7. Значения $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) (в Гц) в МТРА-эфирах соединения **28**

в соединении **30** были предложены на основании биогенетического родства с соединениями **28**, **29**, **31** и **32**. Соединение **30** названо претриходермамидом F.

Кроме новых претриходермамидов D–F (**28–30**) из гриба *Penicillium* sp. КММ 4672 выделены также известные претриходермамид С (**31**) и *N*-метилпретриходермамид В (**32**).

Было исследовано действие соединений **28–32** на выживаемость и индукцию апоптоза в клетках рака простаты человека. В недавно опубликованной работе *N*-метилпретриходермамид В в концентрации до 10 мкМ не показал какого-либо цитотоксического действия в отношении ряда различных раковых клеток. МТТ метод выявил, что и *N*-метилпретриходермамид В (**32**) является высокоцитотоксичным для клеток 22Rv1, РС-3 и LNCaP с ИК₅₀ 0,51, 5,11 и 1,76 мкМ соответственно, при этом соответствующие значения ИК₅₀ для доцетакселя (вещество сравнения) составляли 0,013, 0,015 и 0,004 мкМ. Стоит отметить, что соединение **32** индуцировало апоптоз в клетках простаты человека линии 22Rv1 (31,3 ± 8,2 % апоптоза после инкубирования с соединением в концентрации 1 мкМ в течение 48 ч), которые являются высокоустойчивыми к терапии, направленной на андрогеновый рецептор из-за потери лигандсвязывающего домена в этом рецепторе. Соединения **28–31** не проявили цитотоксической активности в отношении использованных клеток в концентрации до 100 мкМ. Также ни одно из исследованных соединений не оказало значительного эффекта на прогрессию клеточного цикла в той же концентрации. Стоит отметить, что *N*-метилпретриходермамид В (**32**), показывающий ингибирующую концентрацию (ИК₅₀) в наномолярном диапазоне концентраций, был наиболее активен в отношении именно таких клеток, которые устойчивы к гормональной терапии. Кроме того, было исследовано действие соединений **28–32** на клетки мышинной карциномы Эрлиха и нетрансформированные клетки мышей (спленоциты и эритроциты). *N*-метилпретриходермамид В не показал гемолитической активности в концентрации до 100 мкМ и был цитотоксичным для спленоцитов только в высоких концентрациях (ED₅₀ 62,1 мкМ).

Таким образом, из четырех морских изолятов грибов рода *Penicillium*, живущих на морских растениях, выделено несколько структурных серий новых вторичных метаболитов, включая декалиновые сесквитерпеноиды томимарины, соединения поликетидного происхождения – паллидопениллины, структурно близкие к ним зостеропениллины и 1,2-оксазадекалиновые эпидитиодикетипиперазины претриходермамиды D–F. Была изучена биологическая активность полученных метаболитов и показаны перспективные цитотоксические свойства по отношению к опухолевым клеткам, а для некоторых из них – иммуномодулирующие и канцер-превентивные свойства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Afyatullof S.S., Leshchenko E.V., Sobolevskaya M.P., Denisenko V.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Hoai T.P.T., Dmitrenko P.S. Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Berdyshev D.V. New eudesmane sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Phytochem. Lett. 2015. Vol. 14. P. 209–214.
2. Afyatullof S.S., Leshchenko E.V., Berdyshev D.V., Sobolevskaya M.P., Antonov A.S., Denisenko V.A., Popov R.S., Pivkin M.V., Udovenko A.A., Pisyagin E.A., Von Amsberg G., Dyshlovoy S.A. Zosteropenillines: Polyketides from the marine-derived fungus *Penicillium thomii* // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, N 2. P. 5020046.
3. Bhatnagar I., Se-Kwon Kim. Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies // Mar. Drugs. 2010. Vol. 8, N 10. P. 2702–2720.
4. Cueto M., Jensen P.R., Kauffman C., Fenical W., Lobkovsky E., Clardy J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge // J. Nat. Prod. 2001. Vol. 64. P. 1444–1446.
5. Debbab A., Aly A.H., Lin W.H., Proksch P. Bioactive compounds from marine Bacteria and Fungi // Microbial Biotechnology. 2010. Vol. 3, N 5. P. 544–563.
6. Folmer F., Jaspars M., Diederich M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds // Phytochem. Rev. 2010. Vol. 9. P. 557–579.
7. Isaka M., Suyarnestakorn C., Tanticharoen M., Kongsaeer P., Thebtaranonth Y. Aigialomycins A–E, new resorcylic macrolides from the marine mangrove fungus *Aigialus parvus* // J. Org. Chem. 2002. Vol. 67. P. 1561–1566.
8. Itokawa H., Morita H., Watanabe K., Mihashi S., Iitaka Y. Agarofuran-type, eudesmane-type and eremophilane-type sesquiterpenoids from *Alpinia-Japonica* (Thunb.) // Chem. Pharm. Bull. 1985. Vol. 33 (3). P. 1148–1153.

9. Mathan S., Subramanian V., Nagamony S., Ganapathy K. Isolation of endophytic fungi from marine algae and its bioactivity // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 4, N 1. P. 45–49.
10. Orfali R.S., Aly A.H., Ebrahim W., Abdel-Aziz M.S., Müller W.E.G., Lin W., Daletos G., Proksch P. Pretrichodermamide C and N-methylpretrichodermamide B, two new cytotoxic epidithiodiketopiperazines from hyper saline lake derived *Penicillium* sp. // *Phytochem. Lett.* 2015. Vol. 11. P. 168–172.
11. Osterhage C., Kaminsky R., König G.M., Wright A.D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae* // *J. Org. Chem.* 2000. Vol. 65. P. 6412–6417.
12. Osterhage C., König G.M., Holler U., Wright A.D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea* // *J. Nat. Prod.* 2002. Vol. 65. P. 306–313.
13. Rateb M.E., Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitants // *Nat. Prod. Rep.* 2011. Vol. 28. P. 290–344.
14. Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Hoai T.P.T., Denisenko V.A., Dyshlovoy S.A., Kirichuk N.N., Khudyakova Y.V., Kim N.Y., Berdyshev D.V., Pisyagin E.A., Kuzmich A.S., Popov R.S., Antonov A.S., Afiyatullof S.S. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 // *J. Nat. Prod.* 2016. Vol. 79. P. 3031–3038.
15. Sun R.R., Miao F.P., Zhang J., Wang G., Yin X.L., Ji N.Y. Three new xanthone derivatives from an algicolous isolate of *Aspergillus wentii* // *Magn. Reson. Chem.* 2012. Vol. 51. P. 65–68.
16. Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou A.S., Kim G.D., Choi H.D., Kang J.S., Hong J., Son B.W. Flavusides A and B, antibacterial cerebrosides from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus* // *Chem. Pharm. Bull.* 2011. Vol. 59. P. 1174–1177.
17. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Ivanets E.V., Kalinovsky A.I., Khudyakova Y.V., Kirichuk N.N., Popov R.S., Bokemeyer C., Amsberg G., Chingizova E.A., Afiyatullof S.S., Dyshlovoy S.A. Pretrichodermamides D–F from a marine algicolous fungus *Penicillium* sp. KMM 4672 // *Mar. Drugs.* 2016. Vol. 14, N 7. P. 122.
18. Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Leshchenko E.V., Kirichuk N.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoy S.A., Zakharenko A.M., Kim N.Yu., Afiyatullof Sh.Sh. Meroterpenoids from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling // *J. Nat. Prod.* 2014. Vol. 77. P. 1390–1395.
19. Zhuravleva O.I., Sobolevskaya M.P., Afiyatullof Sh.Sh., Kirichuk N.N., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Yurchenko E.A., Dyshlovoy S.A. Sargassopenillines A–G, 6,6-spiroketal from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* and *Penicillium lividum* // *Mar. Drugs.* 2014. Vol. 12, N 12. P. 5930–5943.
20. Zhuravleva O.I., Afiyatullof Sh.Sh., Denisenko V.A., Ermakova S.P., Slinkina N.N., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu. Secondary metabolites from a marine-derived fungus *Aspergillus carneus* Blochwitz // *Phytochemistry.* 2012. Vol. 80. P. 123–131.

Р.В. УСОЛЬЦЕВА, Т.Н. ЗВЯГИНЦЕВА, С.П. ЕРМАКОВА

Структурное разнообразие ламинаранов бурых водорослей, перспективы их использования

В обзоре приведены краткие общие сведения о ламинаранах – полисахаридах бурых водорослей, описаны методы их выделения, установления структур и известные структурные типы, а также обсуждены перспективы использования ламинаранов из дальневосточных бурых водорослей.

Ключевые слова: бурые водоросли, ламинараны, структура, методы.

The structural diversity of laminarans of brown algae. Prospects for use of laminarans. R.V. USOLTSEVA, T.N. ZVYAGINTSEVA, S.P. ERMAKOVA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The review briefly describes general information about laminarans – polysaccharides of brown algae, methods of their isolation and structural elucidation, and also prospects for use of laminarans from Far-Eastern brown algae.

Key words: brown algae, laminarans, structure, methods.

Общие сведения

Ламинараны – водорастворимые полисахариды бурых водорослей, выполняющие функцию запасного вещества. Впервые выделены в 1885 г. Шмидебергом из *Laminaria*, откуда и получили свое название [42]. Легко растворимы в горячей воде, бесцветные аморфные, без запаха и вкуса. Их содержание и характеристики структуры зависят от вида, стадии развития, условий произрастания и сезона сбора водоросли. Было показано, что ламинараны накапливаются в процессе развития водоросли, т.е. их содержание тесно связано с ее жизненным циклом [25, 41]. Содержание ламинаранов в некоторых водорослях в высушенном и обезжиренном состоянии может достигать более 20 % массы [10].

Структура ламинаранов

Ламинараны построены из остатков β -D-глюкозы, соединенных либо только 1,3-, либо 1,3- и 1,6-гликозидными связями. Соотношение 1,3- : 1,6-связей и типы включения их в молекулу могут различаться. Ламинараны содержат на восстанавливающих концах остатки маннита (М-цепи) или глюкозы (G-цепи) [2]. Молекулярная масса

*УСОЛЬЦЕВА Роза Владимировна – кандидат химических наук, научный сотрудник, ЗВЯГИНЦЕВА Татьяна Николаевна – доктор химических наук, главный научный сотрудник, ЕРМАКОВА Светлана Павловна – доктор химических наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Еякова, Владивосток). *E-mail: Usoltseva-R@yandex.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке ДВО РАН (грант № 18-4-010) и РФФИ (грант № 18-34-20013).

большинства ламинаранов невелика – от 3 до 10 кДа. Фракции этих полисахаридов с необычно большой молекулярной массой были получены из принадлежащих к порядку Laminariales *Saccharina cichorioides* (15–20 кДа), *Saccharina gurjanovae* (6–25 кДа) и *Eisenia bicyclis* (19–27 кДа) [3, 10, 49]. Тем не менее следует отметить, что данные водоросли продуцируют также полисахариды с обычной для этой группы соединений молекулярной массой [2, 20, 47].

Ламинараны с наиболее простой структурой были выделены из *Laminaria hyperborea*, *S. gurjanovae* и *Turbinaria conoides*, представляли собой практически линейные 1,3-глюканы с содержанием 1,6-связанных остатков глюкозы не более 1–2 % [10, 15, 36]. Они нерастворимы в холодной воде, в то время как их аналоги, имеющие в составе большее количество 1,6-связанных остатков глюкозы, легко в ней растворяются [36].

Большинство известных ламинаранов содержат основную цепь из 1,3-связанных остатков глюкозы с ответвлениями в виде единичных остатков глюкопиранозы по С6. Соотношение связей 1,3- : 1,6- в этих случаях может быть 3–10 : 1. Ламинараны такого типа присутствуют у *Desmarestia viridis* (порядок Desmarestiales), *Dictyota dichotoma* (порядок Dictyotales), *Alaria angusta*, *A. marginata*, *Saccharina cichorioides*, *S. gurjanovae*, *S. japonica* (порядок Laminariales), *Coccophora langsdorfii*, *Sargassum duplicatum*, *S. fusiforme*, *S. trichophyllum*, *Turbinaria murrayana* (порядок Fucales) [2, 10, 11, 19, 23, 24, 30, 33, 44–46, 49].

Ламинаран из *D. dichotoma* (1,3- : 1,6- = 3 : 1) представляет собой практически регулярный полисахарид, содержащий преимущественно повторяющиеся тетрасахаридные звенья из трех 1,3-связанных остатков β-D-глюкопиранозы и ответвления в виде единичного остатка глюкозы по атому С6 [45]. Из *S. cichorioides* и *S. gurjanovae* выделены нерегулярные по структуре ламинараны, где 1,6-связанные остатки глюкозы в молекулах были сосредоточены в основном вблизи невозстанавливающих концов. Ламинаран из *Fucus evanescens* содержит основную цепь из 1,3-связанных остатков глюкозы, но ответвления по С6 представлены как остатками глюкозы, так и короткими 1,6-связанными цепями (1,3- : 1,6- = 4 : 1) [2].

В некоторых случаях встречаются гораздо более сложные структуры. Так, ламинараны из *Chorda filum* [8], *E. bicyclis* [34], *Ecklonia radiata* [38] (Laminariales) и *Cystophora scalaris* [38] (Fucales) – это разветвленные β-D-глюканы с высоким содержанием 1,6-связей, включающие в основную цепь как 1,3-, так и 1,6-связанные остатки глюкозы.

Структура высокомолекулярного (19–27 кДа) ламинарана из *E. bicyclis* была тщательно изучена. Основная цепь данного сильно разветвленного, сложного по строению полимера содержит 1,3- и 1,6-связанные остатки β-D-глюкозы. Протяженность участков из 1,3-связанных остатков глюкозы составляла не более четырех, а из 1,6- – не более трех моносахаридных остатков. Основная часть 1,6-связанных остатков глюкозы сосредоточена на невозстанавливающих концах молекул. В ответвлениях по положению 6 были обнаружены остатки не только глюкозы, но и гентиобиозы, гентиотриозы и ламинариолигосахаридов.

Интересный ламинаран получен из *Ascoseira mirabilis* [21]. Он содержал значительное количество как 1,3-, так и 1,6-связанных остатков глюкозы, но, в отличие от вышеописанных случаев, в его структуре было очень мало 1,3,6-связанных остатков. Этот факт свидетельствует либо о слаборазветвленной блочной структуре молекулы, либо о наличии небольшого количества длинных 1,6-связанных боковых цепей.

Приведенные данные о структурах ламинаранов показывают, что они очень разнообразны.

Методы выделения и очистки ламинаранов

Для структурного исследования, а также дальнейшего определения биологической активности необходимо получение индивидуальных фракций ламинаранов. Способы выделения и очистки напрямую зависят от свойств этих полисахаридов. Желательно,

чтобы полисахаридные экстракты содержали минимальное количество примесей, поэтому водоросли предварительно обрабатывают органическими растворителями, например 70–80%-м водным этанолом [33, 46, 47] или смесью этанола, ацетона и хлороформа [20], для удаления низкомолекулярных веществ, белков и липидов.

Водоросли содержат два типа водорастворимых полисахаридов – ламинараны и фукоиданы, а также щелочерастворимые альгиновые кислоты. Экстракция ламинаранов может быть проведена растворами хлорида кальция [35, 47] или разбавленных кислот [2, 10, 12, 14, 32], которые препятствуют извлечению альгинатов. В исследовании [14] были разработаны оптимальные условия для экстракции: образец водоросли обрабатывали 0,09 N раствором соляной кислоты (1 : 10, pH 2,4) при перемешивании в течение 30–60 мин. Было показано, что температура во время процесса может достигать 70 °C без деструкции полисахарида. Сравнение выходов ламинаранов при горячей и холодной кислотных экстракциях показало, что при повышении температуры выходы значительно возрастают [18]. Использование ультразвуковой обработки сокращает время экстракции до 15 мин и, вероятно, позволяет получить полисахариды с более высокой молекулярной массой [26].

Поскольку ламинараны являются нейтральными полисахаридами, а фукоиданы – заряженными, их можно разделить с помощью анионообменной хроматографии на различных носителях, например Macro-Prep DEAE, DEAE-целлюлозе, DEAE-Bio Gel [10, 20, 24]. Ламинараны элюируют водой, а фукоиданы задерживаются на колонке. К сожалению, при таком способе очистки не устраняются примеси низкосульфатированных фукоиданов, а также полиманнуровой кислоты, и поэтому прибегают дополнительно к гель-проникающей хроматографии [30, 47].

В работе [48] был предложен новый удобный метод очистки ламинаранов методом гидрофобной хроматографии на Полихроме-1 (политетрафторэтилен): полиманнуровую кислоту и фукоиданы элюируют водой, а ламинаран – раствором 15%-го водного этанола [32, 33, 46, 49].

Методы структурного исследования ламинаранов

При определении выделенного полисахарида вначале необходимо подтвердить, что его моносахаридная композиция представлена только остатками глюкозы. Для этой цели ламинаран гидролизуют, получая моносахариды, которые превращают в ацетаты полиолов и идентифицируют методом газожидкостной хроматографии с глюкозой в качестве стандарта [38, 44].

Фракции ламинаранов, как и других природных полисахаридов, представляют собой смесь молекул различной степени полимеризации. Среднюю молекулярную массу обычно определяют с помощью гельпроникающей хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии [2, 22, 30, 45], степень полимеризации (DP) – методами масс-спектрометрии [17, 39]. В некоторых случаях DP также можно рассчитать сравнением площадей пиков H1 всех остатков глюкозы в молекуле и восстанавливающего концевых остатка в спектре ЯМР ¹H [27].

Типы связей и наличие/отсутствие ответвлений в молекулах ламинаранов выясняют методом метилирования или инструментальным исследованием с помощью спектроскопии ЯМР.

Суть одного из основных методов метилирования [16] в том, что навеску ламинарана растворяют в диметилсульфоксиде и обрабатывают измельченным гидроксидом натрия и метилиодидом. В этих условиях свободные гидроксильные группы превращаются в метиловые эфиры. После гидролиза полисахарида полученные метилированные производные превращают метанолизом с последующим ацетилизацией в ацетаты частично метилированных полиолов и идентифицируют их с помощью стандартных методик хромато-масс-спектрометрии [13].

Спектроскопия 1D (^1H , ^{13}C) и 2D (COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC) ЯМР позволяет надежно интерпретировать сигналы С и Н в различных структурных типах остатков глюкозы, а также определить типы связей между моносахаридными остатками [10, 44, 45]. Соотношение 1,3- : 1,6-связей можно оценить сравнением интенсивности соответствующих аномерных сигналов в спектре ^1H ЯМР [27]. Наличие/отсутствие остатков маннита и соотношение М- и G-цепей во фракции ламинарана может быть определено с помощью спектроскопии ЯМР C^{13} [2, 33], а также масс-спектрометрии [17, 39].

Периодатное окисление является классическим методом структурного анализа полисахаридов. Для оценки присутствия 1,6-связей в молекуле ламинарана проводится измерение расхода периодата и высвобождения муравьиной кислоты [21, 31, 47]. Модификацией метода периодатного окисления является деградация по Смиту, которая включает последовательное окисление полисахарида периодатом натрия, затем восстановление боргидридом натрия и мягкий гидролиз полученного продукта. В результате происходит разрыв связей С–С между двумя гликольными группами, а 1,3-связанные фрагменты молекул ламинарана не разрушаются. Поэтому данный метод применяется для определения характера включения 1,6-связей: либо в основной цепи полисахарида, либо в ответвлениях. В случае, когда 1,6-связанные остатки глюкозы включены в основную цепь ламинарана, полисахарид деградирует с образованием 1,3-связанных олигосахаридов [8, 34]. Если же основная цепь состоит только из 1,3-связанных остатков глюкозы, а 1,6-связанные остатки находятся в ответвлениях, то эти остатки разрушаются, а из основной цепи нативного ламинарана образуется линейный 1,3-связанный глюкан [2].

Использование специфических ферментов – 1,3- β -D-глюканаз позволяет идентифицировать ламинараны и изучать их структурные особенности без применения деструктивных химических модификаций. Существуют ферменты с различным типом действия: эндоглюканазы, расщепляющие внутренние связи в глюкане, и экзоглюканазы, которые последовательно отщепляют моносахариды (иногда олигосахариды) начиная с невосстанавливающего конца молекулы полисахарида [2, 34, 38]. Скорость накопления моно- и олигосахаридов в процессе гидролиза ламинарана экзоферментами указывает на распределение 1,6-связанных остатков глюкозы в молекуле ламинарана. Обработка эндоламинариназами позволяет получить олигосахариды с более простыми структурами, которые могут быть исследованы другими методами [1, 34, 37, 43].

Перспективы использования ламинаранов из дальневосточных бурых водорослей

В морях Дальнего Востока России имеются промышленные запасы водорослей из семейства Laminariaceae (*S. cichorioides*, *S. gurjanovae*, *S. japonica*) – главных продуцентов ламинаранов, содержание которых в их талломах достигает 7–15 %. Данные вещества, выделенные нами из дальневосточных ламинариевых, обладают иммуномодулирующим [6, 28], противоопухолевым [2, 10, 20, 49], радиопротекторным [7], криопротекторным действием [5], защищают икру и мальков лососевых рыб от заражения сапролегнией [4, 29], растения – от вируса табачной мозаики и виroidной инфекции [9, 40]. Таким образом, наши исследования показывают, что ламинараны из дальневосточных водорослей имеют реальный потенциал для использования их в качестве БАД, в медицине, рыбоборозведении, сельском хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елякова Л.А., Исаков В.В., Лапшина Л.А., Нагорская В.П., Лихацкая Г.Н., Звягинцева Т.Н., Реунов А.В. Ферментативная трансформация биологически активного 1,3;1,6- β -D-глюкана. Структура и активность полученных фрагментов // Биохимия. 2007. Т. 72, № 1. С. 36–44.

2. Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А.. Структура ламинаранов из некоторых бурых водорослей // Биооргани. химия. 1994. Т. 20, № 12. С. 1349–1358.
3. Меньшова Р.В., Ермакова С.П., Ум Б.Х., Звягинцева Т.Н. Состав и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли *Eisenia bicyclis* // Биология моря. 2013. Т. 39, № 3. С. 213–218.
4. Пат. № 2034026 С1 РФ, МПК С12N5/04. Криопротектор животных клеток / Л.А. Елякова, Г.Н. Лихацкая, Т.Н. Звягинцева, Д.Л. Аминин. Оpubл. 30.04.95, Бюл. № 12.
5. Пат. № 2081575 С1 РФ, МПК А01К61/00, А61К35/80. Способ профилактики заболевания икры и молоди рыб сапролегнией / Л.А. Елякова, М.И. Киселева, Т.Н. Звягинцева. Оpubл. 20.06.97, Бюл. № 17.
6. Пат. № 2095417 С1 РФ, МПК С12P19/04, 19/16, А61К35/80. Способ получения глюкана, обладающего иммуностимулирующей активностью / Л.А. Елякова, Т.Н. Звягинцева, Н.М. Шевченко. Оpubл. 10.11.97, Бюл. № 31.
7. Пат. № 2097059 С1 РФ, МПК А61К35/80, А61К35/80, А61К31:715. Способ лечения костно-мозговой формы острой лучевой болезни / К.С. Чертков, В.Г. Чотий, З.А. Стеймацкая, Т.А. Нестерова, Л.А. Елякова, Т.Н. Звягинцева, Н.М. Шевченко, Н.Н. Беседнова, Л.А. Игнатенко. Оpubл. 27.11.97, Бюл. № 33.
8. Усов А.И., Чижов А.О. Полисахариды водорослей. XL. Углеводный состав бурой водоросли *Chorda filum* // Биооргани. химия. 1989. Т. 15, № 2. С. 208–216.
9. Федорова В.Я., Романова С.А., Звягинцева Т.Н., Анненков Б.Г., Реунов А.В., Елякова Л.А. О возможности применения 1,3;1,6-β-D-глюканов бурых водорослей для раннего выявления вирусной инфекции в картофеле // Сельхоз. биология. 2004. № 5. С. 119–123.
10. Шевченко Н.М., Анастук С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренко П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. Полисахаридный и липидный состав бурой водоросли *Laminaria gurjanovae* // Биооргани. химия. 2007. Т. 33. С. 96–107.
11. Шевченко Н.М., Усольцева (Меньшова) Р.В., Ишина И.А., Ермакова С.П., Tinh P.D., Ly В.М., Структурные характеристики и противоопухолевая активность *in vitro* водорастворимых полисахаридов бурых водорослей Дальнего Востока России и Вьетнама // Химия природ. соедин. 2017. № 1. С. 5–8.
12. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.M. Isolation of water insoluble laminaran-like polysaccharide from *Sargassum linifolium* // Qual. Plant. Mater. Veg. 1973. Vol. 22. P. 181–187.
13. Bjoerndal H., Hellerquist C.G., Lindberg B., Svensson S. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides // Angew. Chem. Int. Ed. 1970. Vol. 9. P. 610–619.
14. Black W.A.P., Cornhill W.J., Dewar E.T., Woodward F.N. Manufacture of algal chemicals. III. Laboratory-scale isolation of laminarin from brown marine algae // J. Appl. Chem. 1951. Vol. 1. P. 505–517.
15. Chattopadhyay N., Ghosh T., Sinha S., Chattopadhyay K., Karmakar P., Ray B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity // Food Chem. 2010. Vol. 118. P. 823–829.
16. Chiucanu I., Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates // Carbohydr. Res. 1984. Vol. 131. P. 209–217.
17. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Reason A.J., Haslam S.M., McDowell R.A., Chizhov O.S., Usov A.I. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry // Carbohydr. Res. 1998. Vol. 310. P. 203–210.
18. Delaney G., Jacob S., Featherstone C., Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines // Cancer. 2005. Vol. 104. P. 1129–1137.
19. El-Sayed M.M. The polysaccharides of the brown seaweed *Turbinaria murrayana* // Carbohydr. Res. 1982. Vol. 110. P. 277–282.
20. Ermakova S., Men'shova R., Vishchuk O., Kim S.M., Um B.H., Isakov V., Zvyagintseva T. Water-soluble polysaccharides from the brown algae *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity // Algal Res. 2013. Vol. 2. P. 51–58.
21. Finch P., Percival E., Slaiding I.R., Weigel H. Carbohydrates of the antarctic brown seaweed *Ascoseira mirabilis* // Phytochemistry. 1986. Vol. 25. P. 443–448.
22. Gomez-Ordenez E., Jimenez-Escrig A., Ruperez P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) // Talanta. 2012. Vol. 93. P. 153–159.
23. Imbs T.I., Ermakova S.P., Malyarenko (Vishchuk) O.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Cocophora langsdorffii* and *in vitro* investigation of their anticancer activity // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 135. P. 162–168.
24. Jin W., Zhang W., Wang J., Ren S., Song N., Duan D., Zhang, Q. Characterization of laminaran and a highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme* // Carbohydr. Res. 2014. Vol. 385. P. 58–64.
25. Jin W., Liu G., Zhong W., Sun C., Zhang Q. Polysaccharides from *Sargassum thunbergii*: Monthly variations and anti-complement and anti-tumour activities // Int. J. Biol. Macromol. 2017. Vol. 105. P. 1526–1531.
26. Kadam S.U., O'Donnell C.P., Rai D.K., Hossain M.B., Burgess C.M., Walsh D., Tiwari B.K. Laminarin from Irish brown seaweeds *Asophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity // Mar. Drugs. 2015. Vol. 13. P. 4270–4280.
27. Kim Y.T., Kim E.H., Cheong C., Williams D.L., Kim C.W., Lim S.T. Structural characterization of β-D-(1→3,1→6)-linked glucans using NMR spectroscopy // Carbohydr. Res. 2000. Vol. 328. P. 331–341.
28. Kiseleva M.I., Balabanova L.A., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. Effect of 1,3;1,6-beta-D-glucans on developing sea urchin embryos // Mar. Biotechnol. 2008. Vol. 10. P. 466–470.
29. Kiseleva M.I., Balabanova L.A., Elyakova L.A., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. Influence of egg treatments with 1,3;1,6-beta-D-glucans on chum salmon development and susceptibility to *Saprolegnia infection* // J. Fish Dis. 2014. Vol. 37. P. 3–10.

30. Lee J.B., Takeshita A., Hayashi K., Hayashi T. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum* // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 86. P. 995–999.
31. Maeda M., Nishizawa K. Laminaran of *Ishige okamurai* // Carbohydr. Res. 1968. Vol. 7. P. 97–99.
32. Malyarenko O.S., Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. *In vitro* anticancer activity of the laminarans from Far Eastern brown seaweeds and their sulfated derivatives // J. Appl. Phycol. 2017. Vol. 29. P. 543–553.
33. Menshova R.V., Anastyuk S.D., Ermakova S.P., Shevchenko N.M., Isakov V.I., Zvyagintseva T.N. Structure and anticancer activity *in vitro* of sulfated galactofucan from brown alga *Alaria angusta* // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 132. P. 118–125.
34. Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastyuk S.D., Isakov V.V., Dubrovskaya Yu.V., Kusaykin M.I., Um B.H., Zvyagintseva T.N. Structure, enzymatic transformation and anticancer activity of branched high molecular weight laminaran from brown alga *Eisenia bicyclis* // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 99. P. 101–109.
35. Mian A.J., Percival E. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*. Pt I. Extraction and fractionation // Carbohydr. Res. 1973. Vol. 26. P. 133–146.
36. Nelson T.E., Lewis B.A. Separation and characterization of the soluble and insoluble components of insoluble laminaran // Carbohydr. Res. 1974. Vol. 33. P. 63–74.
37. Pang Z., Otaka K., Maoka T., Hidaka K., Ishijima S., Oda M., Ohnishi M. Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. Vol. 69. P. 553–558.
38. Ram S., Beyer R., Shepherd M.G., Sullivan P.A. Isolation and analysis of neutral glucans from *Ecklonia radiata* and *Cystophora scalaris* // Carbohydr. Res. 1981. Vol. 96. P. 95–104.
39. Read S.M., Currie G., Bacic A. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry // Carbohydr. Res. 1996. Vol. 281. P. 187–201.
40. Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P., Elyakova L.A. Effect of 1,3;1,6- β -D-glucan on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus // J. Phytopathol. 2008. Vol. 144. P. 247–249.
41. Rioux L.-E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Effect of season in the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicurvis* // Phytochemistry. 2009. Vol. 70. P. 1069–1075.
42. Schmiedeberg J.E.O. Ueber die Bestandtheile der Laminaria // Tageblatt der 58. Versammlung Deutscher Naturforscher und Aerzte in Strassburg 18.–23. September 1885 / red. J. Stilling. Strassburg: G. Fischbach, 1885. S. 427.
43. Sova V.V., Zvyagintseva T.N., Svetasheva T.G., Burtseva Yu.V., Elyakova L.A. Comparative characterization of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by β -1,3-glucanases from various sources // Biochemistry. 1997. Vol. 62. P. 1113–1118.
44. Usoltseva R.V., Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Surits V.V., Silchenko A.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Thinh P.D., Ermakova S.P. Polysaccharides from brown alga *Sargassum duplicatum*: the structure and anticancer activity *in vitro* // Carbohydr. Polym. 2017. Vol. 175. P. 547–556.
45. Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Malyarenko O.S., Ishina I.A., Ivannikova S.I., Ermakova S.P. Structure and anticancer activity of native and modified polysaccharides from brown alga *Dictyota dichotoma* // Carbohydr. Polym. 2018. Vol. 180. P. 21–28.
46. Usoltseva (Menshova) R.V., Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P. The comparison of structure and anticancer activity *in vitro* of polysaccharides from brown algae *Alaria marginata* and *A. angusta* // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 153. P. 258–265.
47. Usui T., Toriyama T., Mizuno T. Structural investigation of laminaran of *Eisenia bicyclis* // Agric. Biol. Chem. 1979. Vol. 43. P. 603–611.
48. 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. Vol. 322. P. 32–39.
49. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V., Isakov V.V. Water-soluble polysaccharides of some Far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. Vol. 294. P. 1–13.

Д.Л. АМИНИН, И.Г. АГАФОНОВА, Г.Н. ЛИХАЦКАЯ,
Е.Л. ЧАЙКИНА, М.М. АНИСИМОВ

Лаборатория биоиспытаний ТИБОХ ДВО РАН: история и перспективы исследований биологически активных соединений

Основное научное направление лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН – изучение биологической активности природных и синтетических соединений. В обзоре рассматриваются основные достижения лаборатории начиная с момента ее основания в 1974 г. и до наших дней. Описываются успехи в изучении фиторегулирующей, антимикробной, цитотоксической и противоопухолевой активности, результаты поиска соединений с иммуномодулирующими свойствами. Рассматриваются результаты исследования цитопротекторов на моделях ишемии и инфаркта миокарда, инсульта головного мозга и артериальной гипертензии; приводятся достижения в области реконструкции биологически активных соединений в бислойные липидные мембраны и компьютерного моделирования пространственной структуры молекул и их взаимодействия с внутриклеточными и мембранными мишенями.

Ключевые слова: биологически активные природные и синтетические соединения, поиск биологической активности.

Laboratory of bioassays of the PIBOC FEB RAS: history and prospects of research on biologically active compounds. D.L. AMININ, I.G. AGAFONOVA, G.N. LIKHATSKAYA, E.L. CHAYKINA, M.M. ANISIMOV (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The main scientific direction of the laboratory of bioassays and mechanism of action of biologically active compounds of the PIBOC FEB RAS is the study on the biological activity of natural and synthetic compounds. The review examines the main achievements of the laboratory, since its foundation in 1974, to our days. The advances in the study of phyto-regulatory, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities; search for compounds with immunomodulatory properties; study of cytoprotectors on models of ischemia and myocardial infarction, cerebral stroke and arterial hypertension; reconstruction of biologically active compounds into bilayer lipid membranes; computer simulation of spatial structures of molecules and their interaction with intracellular and membrane targets are described.

Key words: biologically active natural and synthetic compounds, search for biological activity.

Лаборатория биоиспытаний была создана в 1974 г. и в 1989 г. переименована в лабораторию биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ. Первым ее руководителем с 1974 по 2003 г. был д.б.н., профессор Михаил Михайлович Анисимов. С 2003 г. по настоящее время лабораторию возглавляет д.б.н. Дмитрий Львович Аминин.

Основные научные направления лаборатории: изучение биологической активности природных и синтетических веществ; скрининг химических соединений для обнаружения

*АМИНИН Дмитрий Львович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией, АГАФОНОВА Ирина Григорьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ЛИХАЦКАЯ Галина Николаевна – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, ЧАЙКИНА Елена Леонидовна – научный сотрудник, АНИСИМОВ Михаил Михайлович – доктор биологических наук, профессор (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: daminin@piboc.dvo.ru

противомикробной, цитотоксической, гемолитической, эмбриотоксической и противоопухолевой активности на моделях культур клеток животных и человека; поиск соединений с гепатозащитными и иммуномодулирующими свойствами; исследование веществ, обладающих протекторными свойствами на экспериментальных моделях ишемии и инфаркта миокарда, инсульта головного мозга, артериальной гипертензии, фиброза и цирроза печени; изучение фиторегулирующей активности на моделях проростков сельскохозяйственных растений; реконструкция соединений в бислойные липидные мембраны и исследование их влияния на проницаемость биомембран; установление зависимости между структурой веществ и их биологической активностью; компьютерное моделирование пространственных структур биологических молекул и их взаимодействия с внутриклеточными и мембранными мишенями.

Объектами исследования являются биологически активные вещества, выделенные из морских организмов, наземных растений Дальнего Востока и их синтетические аналоги. Биологическая активность экстрактов и индивидуальных соединений исследуется с помощью различных физико-химических и биохимических методов. Для биоиспытаний используются модельные бесклеточные системы, включающие липосомы, бислойные липидные мембраны, субстрат-ферментные тест-системы, лиганд-рецепторные тест-системы, а также культуры клеток животных и человека, включая различные трансгенные клетки со встроенными генами-репортерами, и экспериментальные животные с индуцированными заболеваниями.

В 70–90-е годы прошлого столетия под руководством М.М. Анисимова было проведено масштабное изучение противомикробной, цитотоксической, гемолитической и противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов голостанового, β -амиринового, даммаранового и лупанового рядов. В этой работе активное участие принимали сотрудники лаборатории В.В. Щеглов, Н.Г. Прокофьева, Е.Б. Шенцова, С.И. Стехова, М.И. Киселева, Л.И. Стригина, А.М. Попов, И.Г. Агафонова, Г.Н. Лихацкая, Д.Л. Аминин. В задачу исследований входило изучение влияния гликозидов на биосинтез стероидов, жирных кислот, белков и нуклеиновых кислот, на проницаемость биомембран для УФ-поглощающих соединений и ионов K^+ . В качестве тест-культур использовались культуры различных условно-патогенных бактерий и грибов, эмбрионы морских ежей, эритроциты и мышечные опухолевые клетки. Было оценено влияние различных факторов (композиционного состава, значения pH и температуры инкубационной среды, концентрации тестируемых клеток, времени инкубирования и способов введения веществ) на проявление мембранотропной активности гликозидов [11, 16, 35, 38, 42, 43, 59]. Результатом этих работ стало установление связи между химическим строением и биологической активностью тритерпеновых гликозидов. Были выявлены основные принципы действия гликозидов, позволившие рассматривать тритерпеновые гликозиды в качестве модификаторов структурно-функциональных свойств биологических и модельных липидных мембран.

В лаборатории были изучены физико-химические механизмы взаимодействия тритерпеновых и стероидных гликозидов с мембранами [24–26, 32, 33]. Сравнительное изучение свободных и гликозилированных тритерпеноидов и стероидов, выполненное Г.Н. Лихацкой, А.М. Поповым и их коллегами, выявило различия в механизмах их мембранотропного действия. Как показали исследования, ион-селективные каналы и неселективные поры, образованные гликозидами в мембранах, зависят от структуры агликонной и углеводной частей гликозидов, липидного состава мембран, структуры и количественного содержания стероидов в мембранах. Предложена молекулярная модель действия гликозидов на мембраны, объясняющая особенности стимулирующего действия на клетки низких концентраций и ингибирующего действия высоких концентраций гликозидов [26]. Работы Л.И. Стригиной, связанные с выделением и установлением структуры гликозидов хедерагина и полигонатозидов из дальневосточных растений, легли в основу исследований биологической активности этих природных соединений и молекулярных механизмов их действия [17, 40].

Д.Л. Амининым и М.М. Анисимовым с соавторами было показано, что причиной устойчивости клеток голотурии к собственным мембранолитическим тритерпеновым гликозидам (в частности, к голотоксину A_1 и кукумариозиду G_1) являются очень низкое содержание в этих клетках свободных Δ^5 -стеринов и наличие сульфатированных Δ^5 -стеринов и β -ксилозидов Δ^7 -стеринов [7, 12]. Установлено, что гликозиды голотурий играют важную роль в физиологии организма-продуцента, принимая участие в регуляции процессов размножения этих животных. Показано, что голотоксин A_1 синхронизирует (ингибирует) спонтанное мейотическое созревание ооцитов голотурий, осуществляя тем самым функцию половых гормонов созревания [5, 6, 8, 54]. Данные наблюдения могут быть полезны при разработке биотехнологий искусственного разведения трепанга.

Е.А. Пислягиным и Д.Л. Амининым с соавторами изучен механизм влияния иммуномодулирующего препарата кумазида на различные системы клеточного и гуморального иммунитета. Оказалось, что кумазид стимулирует фагоцитоз и бактерицидную активность лейкоцитов за счет активирования кислородзависимых механизмов киллинга, индуцирует продукцию ФНО- α , стимулирует синтез ИЛ-6 и ИФН- γ , усиливает исходно сниженную экспрессию CD3, CD4, CD8, увеличивает количество антителообразующих клеток, оказывает радиозащитное действие, стимулируя процессы кроветворения, обладает противоопухолевым действием и существенно повышает устойчивость животных к экспериментальным бактериальным инфекциям. Изучен механизм иммуномодулирующего действия кукумариозидов A_2-2 (CA_2-2). Показано, что максимальный иммуностимулирующий эффект гликозида лежит в наномолярном диапазоне концентраций. CA_2-2 вызывает усиление адгезии, распластывания, подвижности и пролиферации иммунных клеток, увеличение синтеза в них АФК и NO, активацию iNOs и лизосомальной активности, меняет морфологию макрофагов, а также активует эти клетки *in vivo*. Изучено фармакокинетическое поведение CA_2-2 в организме животных при различных способах введения, установлены фармакокинетические параметры и распределение гликозида в органе-мишени [57, 58, 72, 74]. Были выявлены молекулярные механизмы иммуномодулирующих свойств CA_2-2 . Методами протеомики выявлен ряд внутриклеточных белков, принимающих непосредственное участие в регуляции активности иммунных клеток, экспрессия которых регулируется в спленоцитах мыши после их инкубирования с CA_2-2 . Впервые доказано, что мембранными молекулярными мишенями иммуномодулирующего действия CA_2-2 являются пуриновые рецепторы P2X4 типа, обеспечивающие Ca^{2+} проводимость в мембране макрофагов. Установлено, что зрелые F4/80⁺ макрофаги с повышенной плотностью пуриновых P2X1 и P2X4 рецепторов представляют собой клетки-мишени, которые принимают участие в Ca^{2+} ответе на действие гликозида [55, 56, 73]. Данный цикл работ позволяет позиционировать недавно созданный иммуномодулирующий препарат «Кумазид» как инновационный.

Первые работы по противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов были выполнены Н.Г. Прокофьевой с соавторами. В результате выявлен противоопухолевый потенциал серии гликозидов голостанового, β -амиринового и даммаранового рядов *in vivo*, показана возможность усиления действия 5-фторурацила и циклофосфана тритерпеновыми гликозидами, установлено, что противоопухолевая активность гликозидов хедерагенина значительно усиливается на фоне искусственной гипергликемии [13, 34, 36].

Позднее Е.С. Менчинской, Д.Л. Амининым и другими сотрудниками лаборатории было установлено, что гликозиды голотурий CA_2-2 и фрондозид А проявляют свойства цитостатиков, блокируют пролиферацию опухолевых клеток и клеточный цикл в S-фазе или фазе митоза G_2/M в зависимости от типа опухолевых клеток, включая устойчивые к цисплатину клетки. Гликозиды вызывают апоптоз опухолевых клеток по каспазозависимому пути, минуя р53-зависимый путь, а также подавляют формирование и рост колоний опухолевых клеток человека, в том числе устойчивых к действию цисплатина, что свидетельствует об их способности тормозить процесс метастазирования. Доказано, что применение CA_2-2 *in vivo* вызывает достоверное увеличение средней продолжительности

жизни животных с инокулированной асцитной карциномой Эрлиха. Кукумариозид А₂-2 и фрондозид А, а также их комплексы с холестерином ингибируют активность мембранного Р-гликопротеина в опухолевых клетках и тем самым блокируют мультилекарственную устойчивость опухолевых клеток [30, 53, 67, 70, 71]. Эта серия исследований свидетельствует о большом терапевтическом потенциале тритерпеновых гликозидов голотурий и перспективе их использования в качестве противоопухолевых средств.

Ю.Н. Лоенко с коллегами исследовали противоопухолевую и иммуномодулирующую активность и механизм действия серии индивидуальных биополимеров морских организмов – митилана, кораллана и ряда других биогликанов морских моллюсков Индопацифики. Изучена возможность применения морских биополимеров в комбинации с известными лекарственными средствами для достижения аддитивного эффекта [28].

Е.Л. Чайкиной и М.М. Анисимовым с соавторами исследована фиторегулирующая активность большой серии природных и синтетических соединений, таких как различные классы липидов, стерин, пигментов, фенольных соединений, полисахаридов и экстрактов ряда растений, в том числе бурых водорослей, а также полисахаридов, выделенных из морских водорослей: ламинарана и фукоидана из *L. cichorioides*, полиманнурановой кислоты и фукоидана из *F. evanescens*, антивира и β -D-глюкоолигосахаридов – продуктов ферментативной трансформации ламинарана. В качестве тест-культур использовали проростки огурца, сои, гречихи и ячменя. Установлены культуры, проростки которых чувствительны к фиторегулирующему действию, и параметры этого регулирующего действия; отобраны наиболее перспективные соединения, использование которых может привести к увеличению урожайности, выносливости различных культур и их устойчивости к бактериальным и вирусным инфекциям [9, 10, 60–65, 69].

А.Е. Юрченко (Демина) и М.М. Анисимов вместе с другими сотрудниками института провели систематическое изучение влияния структуры природных и синтетических циклопентановых β, β' -трикетонов (корусканон А и В и их синтетические аналоги с различной степенью структурного сходства) на их рострегулирующую активность. Отмечено, что под действием этих соединений происходит стимулирование работы белок-синтетического аппарата меристематических клеток проростков, увеличивается в корнях проростков содержание общего растворимого белка на фоне ингибирования их роста, повышается содержание аминокислот, принимающих участие в защите растений от стрессовых повреждений клеток. Установлено, что изученные соединения проявляют свойства ретардантов – регуляторов роста, способствующих большей устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды и тем самым повышающих урожайность сельскохозяйственных культур. В полевых экспериментах показано, что обработка посевов гречихи растворами некоторых циклопентановых β, β' -трикетонов приводит к существенному росту урожайности. Это свидетельствует о целесообразности введения их в практику возделывания гречихи в южных районах Приморского края [20, 37, 45].

В результате многолетних исследований, в том числе испытаний в условиях открытого грунта во Всероссийском НИИ сои (г. Благовещенск) и ДальНИИСХ (г. Хабаровск), из экологически чистого сырья был получен новый ускоритель роста растений – препарат ДВ-47-4. Препарат активно стимулирует ростовые и продукционные процессы в овощных, зернобобовых, плодовых и цветочных культурах, значительно снижает содержание нитратов, пестицидов, гербицидов и солей тяжелых металлов в плодах овощных растений, что позволяет получать экологически чистую продукцию [18, 27, 44].

Е.А. Чингизовой, Е.Л. Чайкиной и М.М. Анисимовым с соавторами выполнен цикл работ по изучению низкомолекулярных метаболитов водорослей Охотского и Японского морей. Впервые были получены данные о биологической активности как суммарных экстрактов, так и отдельных классов низкомолекулярных метаболитов морских водорослей, показаны значимые различия в биологической активности общего, гидрофильного и липофильного экстрактов морских водорослей. Для ряда экстрактов, липидов и фотосинтетических пигментов установлена цитотоксическая, гемолитическая, противомикробная,

фиторегулирующая и антиоксидантная активность, изучена зависимость биологической активности от места и времени сбора водорослевого материала. Из бурых водорослей *F. evanescens* и *E. fistulosa* выделены глицерогликолипиды, проявляющие наибольшую противомикробную активность в отношении микроорганизмов *S. aureus* и *C. albicans* и представляющие интерес в качестве потенциальных противомикробных соединений [14, 15, 29, 41, 61, 66].

Благодаря исследованиям И.Г. Агафоновой с соавторами в лаборатории были освоены методы индуцирования различных экспериментальных патологий у подопытных животных и отработана оценка этих состояний с помощью метода магнитно-резонансной томографии (МРТ). Большой цикл работ выполнен по исследованию противоинсультных (противоишемических) свойств препарата «Гистохром». На модели экспериментального геморрагического инсульта были изучены изменения, возникающие в перифокальной области головного мозга животных, и возможности проведения противоинсультной терапии. Методом МРТ было показано, что назначение препарата «Гистохром» в эксперименте уменьшает выраженность изменений в перифокальной области, а в клинических условиях ускоряет динамику регресса общемозговых и менингеальных симптомов и улучшает реологические свойства крови [19, 39]. Потенциальные противоинсультные свойства этого препарата и 6-гидрокси-2,3-диглутатионильного производного 7-этилнафтазарина (ДГЭ) были исследованы на модели ишемического инсульта. Установлено, что исследуемые соединения сокращают зону ишемии, приводят к ускоренному восстановлению коллатерального кровотока в мозге крыс, быстрейшему уменьшению зоны цитотоксического отека и практически полному восстановлению неврологического статуса, увеличивают среднюю продолжительность жизни экспериментальных животных [4, 50]. Кроме того, для ДГЭ на модели экспериментальной ишемии миокарда мышей был получен выраженный положительный кардиопротекторный эффект [21]. В экспериментах с преждевременно стареющими крысами линии OXYS на модели хронической ишемии выявлены позитивное влияние гистохрома на состояние сосудистого русла головного мозга, усиление коллатерального кровотока и проявление свойств вазодилататора, способствующие восстановлению поисково-исследовательской активности и снижению тревожности крыс [1, 3, 22, 47, 52]. Методами ангиографии и морфометрической томографии изучено влияние гистохрома на изменение эндотелиальных свойств церебральных артерий в модели артериальной гипертензии, сопровождающейся компенсаторной вазодилатацией в корковой области церебральных артерий и артериостенозом во внутренней капсуле ренальных артерий. Показано, что гистохром оказывает не прямое вазодилатирующее воздействие на артерии в области интереса. Этот положительный терапевтический эффект способствует увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных [2, 46, 51]. Результаты этих исследований позволили предложить новое назначение гистохрома – в качестве эффективного средства для терапии инсультов головного мозга.

Были поставлены такие модели заболеваний, как токсический гепатит, фиброз и цирроз печени, хроническая обструктивная болезнь легких, воспаления различных органов, имплантация солидной опухоли. На основе морфометрических данных томографии и ангиографии на модели экспериментального CCl_4 -гепатита крыс изучены гепатозащитные свойства препарата «Максар» и фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* [23]. Противовоспалительная активность коуропитина (трипантрина) была продемонстрирована на модели экспериментального воспаления толстого кишечника у мышей. Выявлено, что препарат эффективно снимает воспаление у животных и увеличивает среднюю продолжительность более чем на 40 % [48, 49]. Изучена противоопухолевая активность широкого ряда соединений, в числе которых наиболее перспективными оказались производные 1,4-нафтохинонов [31] и 3-деметилубихинона Q2 [68].

В лаборатории биоиспытаний накоплен большой массив данных о биологической активности биомолекул и связи структура–активность, но взаимодействие биомолекул на атомном уровне структуры не установлено. В 1998 г. от профессора Е.А. Нурминского,

заведующего лабораторией суперкомпьютерных и распределенных вычислений Института автоматики и процессов управления (ИАПУ) ДВО РАН, поступило предложение об использовании суперкомпьютера для решения задач в области биоорганической химии и биохимии. На первом этапе объектами исследований, проводимых Г.Н. Лихацкой методами компьютерного моделирования, были липидные мембраны, низкомолекулярные биорегуляторы тритерпеновой и стероидной природы, интегральный белок наружной мембраны грамотрицательной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*, цитолизин и нейротоксины морской актинии и комплексы исследуемых молекул с мембранами. При содействии сотрудников ИАПУ были установлены программы по молекулярной динамике и докингу биомолекул, Кембриджская база рентгеноструктурных данных низкомолекулярных соединений и началось их освоение. Первыми пространственными структурами белков, которые были определены в ТИБОХ методами структурной биоинформатики, стали структуры нейротоксинов актиний. Ранее в лаборатории химии пептидов для них были установлены аминокислотные последовательности и изучена их биологическая активность. Методами молекулярного докинга получены полноатомные модели структур токсинов и построены комплексы этих токсинов с ионными каналами. В тесном сотрудничестве с другими лабораториями ТИБОХ методами компьютерного моделирования и структурной биоинформатики с высокой точностью построены полноатомные модели пространственных структур нескольких белков – поринов, иммуноглобулинсвязывающего белка Skp и фосфолипазы А грамотрицательных бактерий рода *Yersinia*. Проведена молекулярная симуляция поринов в липидном бислое, рассчитаны структуры комплексов поринов с антибиотиками, показаны структурные различия OmpF и OmpC поринов иерсиний, построены модели мутантных поринов и модель комплекса тримера Skp с иммуноглобулином человека IgG1. Получены пространственные структуры актинопоринов, нейротоксинов и ингибиторов Кунитц-типа тропической актинии *Heteractis crispa* (прежнее название *Radianthus macrodactylus*), а также актинопоринов актинии *Oulactis orientalis* из Японского моря; обнаружены различия актинопоринов из актиний тропических и северных морей. Построены модели комплексов пептидов актиний с белками-мишенями (G-актином, интегрином, трипсином, химотрипсином и ионными каналами). Получена полноатомная структура маннансвязывающего лектина из целомической жидкости морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Показано, что особенности субстратной специфичности лектина обусловлены различиями в строении петли, участвующей в образовании сайта связывания углеводов. Построена модель структуры маннансвязывающего лектина из дальневосточной голотурии *Apostichopus japonicus* (MBL-AJ) и бифункционального гибрида CmAP/MBL-AJ. Методом *in silico* мутагенеза и молекулярного докинга предсказаны мутации лектина с более высокой углеводсвязывающей активностью, что было подтверждено экспериментально с использованием рекомбинантного бифункционального гибрида.

Построены полноатомные модели пространственных структур гидролитических ферментов из морских организмов и бактерий и установлены структуры их активных центров, в том числе α -N-ацетилгалактозаминидазы из морской бактерии *Arenibacter latericus* КММ 426^T, модифицирующей антигены крови группы А; α -галактозидазы из морской бактерии *Pseudalteromonas* sp. КММ, модифицирующей антигены крови группы В; нуклеазы типа S1 из морского гриба *Penicillium melinii*; эндо-1,3- β -D-глюконаза моллюсков и их комплексов с молекулами субстрата, ингибитором и акцептором. Полноатомные модели пространственных структур получены также для хитозана и его производных, комплексов хитоолигосахаридов с ЛПС, фактором миелоидной дифференциации-2 и толл-подобным рецептором-4. Построены модели комплексов ЛПС с липидным бислоем, модифицированным ацильным производным хитозана, и определены потенциальные сайты связывания и энергии взаимодействия ЛПС с модифицированным бислоем.

За время существования лаборатории биоиспытаний ее сотрудники проводили совместные исследования практически со всеми научными подразделениями ТИБОХ. Наиболее активно развивался творческий союз с лабораториями: химии морских природных

соединений (рук. академик РАН, д.х.н. В.А. Стоник, ныне – к.х.н. Н.В. Иванчина), химии пептидов (рук. д.х.н. Э.П. Козловская), молекулярных основ антибактериального иммунитета (рук. д.х.н., профессор Т.Ф. Соловьева, ныне – к.х.н. В.Н. Давыдова), химии микробных метаболитов (рук. к.х.н. Ш.Ш. Афиятулло), органического синтеза природных соединений (рук. д.х.н. В.Ф. Ануфриев), химии ферментов (рук. д.х.н., профессор Т.Н. Звягинцева, ныне – д.х.н. С.П. Ермакова), химии природных хиноидных соединений (рук. д.х.н. С.А. Федорев), инструментальных и радиоизотопных методов анализа (рук. к.х.н. П.С. Дмитренко). Именно благодаря этому плодотворному сотрудничеству у лаборатории биоиспытаний появился шанс поработать с огромным разнообразием биологически активных соединений, что нашло отражение в большом количестве интересных совместных публикаций.

Следует отметить, что лаборатория биоиспытаний активно сотрудничала и продолжает сотрудничать со многими исследовательскими организациями России и зарубежных стран. Так, знакомство и совместные экспедиции на МЭС с Г.А. Бузниковым (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва) принесли в наш институт методологию работы с эмбрионами морского ежа. Благодаря сотрудничеству с Ю.Г. Ровиным (Институт химии ДВНЦ АН СССР), А.С. Ивановым (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва), Е.А. Корепановой (2-й МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова, Москва), А.В. Лебедевым и Д.О. Левицким (Всесоюзный кардиологический научный центр, Москва), М.П. Борисовой, Л.Н. Ермишкиным и Г.Н. Берестовским (Институт биофизики РАН, Пущино) в лаборатории были поставлены методы БЛМ, сканирующей дифференциальной калориметрии, ион-селективных электродов и техника работы с липосомами. Совместная работа с М.Ю. Мартыновым (Российский государственный медицинский университет, Москва) послужила отправной точкой в МРТ исследованиях головного мозга животных, а сотрудничество с М.Е. Асташевым (Институт биофизики клетки, Пущино) позволило провести уникальные эксперименты с одиночными макрофагами методом пэтч-кламп. Большой вклад в развитие техники работы с трансгенными клеточными культурами внесли совместные проекты с Б.А. Маргулисом (Институт цитологии, Санкт-Петербург), а благодаря сотрудничеству с А.Г. Клыковым (Федеральный научный центр агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск) ведется изучение фиторегулирующей активности химических соединений, в том числе в условиях открытого грунта. Компьютерное моделирование структур биомолекул и их комплексов проводилось в сотрудничестве с сотрудниками ИАПУ ДВО РАН Е.А. Нурминским, И.Б. Клышко, Е.В. Трифоновым и Г.А. Тарасовым, а также сотрудниками Института прикладной математики ДВО РАН М.А. Гузевым, Д.Б. Згонником и М.А. Шепеловым при поддержке Центра коллективного пользования «Дальневосточный вычислительный ресурс» на базе ИАПУ.

Международное сотрудничество лаборатории биоиспытаний отражено в успешных совместных научных проектах и грантах STEPI, NATO, PICES/SCOR, APEC, CRDF, МНТЦ и РФФИ-Тайвань с участием Джона Стайна (Dr. John Stein, Northwest Fisheries Science Center NOAA, Сиэтл, США), Ричарда Аддисона (Dr. Richard Addison, Institute of Ocean Sciences, Сидней, Канада), Дже Рионга О (Dr. Jae Ryoung Oh, Korea Ocean Research and Development Institute, Сеул, Корея), Макса Дейнзера (Dr. M. Deinzer, Oregon State University, Корваллис, Орегон, США), Михаэля Глокера (Dr. Michael Glocker, Proteome Center Rostock, Росток, Германия), Фридмана Хонекера (Dr. Friedemann Honecker, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Гамбург, Германия) и Юнь-Мин Вона (Dr. Yun-Ming Wang, National Chiao Tung University, Синьджу, Тайвань).

Сотрудники лаборатории биоиспытаний принимают активное участие в научных экспедициях института. Так, в 1975–1976 гг. М.М. Анисимов находился в служебной командировке в Республике Куба. Многие сотрудники принимали участие в подготовке и работе экспедиций на НИС «Профессор Богоров» и «Академик Опарин» в тропические районы Мирового океана и дальневосточные моря.

За время существования лаборатории было выполнено и защищено 9 диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 1 диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук и 2 диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонова И.Г., Колосова Н.Г., Мищенко Н.П., Чайкина Е.Л. Влияние гистохрома на состояние сосудов головного мозга и поисково-исследовательскую активность преждевременно стареющих крыс линии OXYS // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007. Т. 134, № 4. С. 123.
2. Агафонова И.Г., Богданович Р.Н., Колосова Н.Г. Оценка нефропротективного потенциала гистохрома в условиях индуцированной артериальной гипертензии // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2015. Т. 160, № 8. С. 187–191.
3. Агафонова И.Г., Котельников В.Н., Мищенко Н.П., Колосова Н.Г. Сравнительное изучение влияния гистохрома и мексидола на структурно-функциональные характеристики мозга преждевременно стареющих крыс линии OXYS методом МРТ // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 150, № 12. С. 686–690.
4. Агафонова И.Г., Ануфриев В.Ф., Машнев Б.П., Козловская Э.П. Средство для лечения ишемии сосудов головного мозга: пат. 2625740 РФ. Заявл. 10.10.2016; опубл. 18.07.2017, Бюл. № 20.
5. Аминин Д.Л., Лебедев А.В., Левицкий Д.О. Влияние голотоксина A_1 на перенос ионов кальция через липидные модели биологических мембран // Биохимия. 1990. Т. 55, № 2. С. 270–275.
6. Аминин Д.Л., Анисимов М.М. Влияние голотоксина A_1 на транспорт Ca^{2+} и мейотическое созревание ооцитов голотурии *Stichopus japonicus* // Журн. эволюцион. биохимии и физиологии. 1990. Т. 26, № 1. С. 9–13.
7. Аминин Д.Л., Анисимов М.М., Мокрецова Н.Д., Стригина Л.И., Левина Э.В. Влияние тритерпеновых и стероидных гликозидов на овоциты, яйца и эмбрионы голотурии *Stichopus japonicus* и морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биол. моря. 1986. № 3. С. 49–52.
8. Аминин Д.Л., Анисимов М.М. Содержание голотоксина в тканях голотурии *Stichopus japonicus* S. в разные сезоны года и их влияние на созревание ооцитов // Журн. эволюцион. биохимии и физиологии. 1987. Т. 23, № 4. С. 545–547.
9. Анисимов М.М., Чайкина Е.Л. Влияние гликозидов хедерагенина из *Caulophyllum robustum* Max. на рост корневых проростков *Cucumis sativus* L. // Химия растит. сырья. 2014. № 4. С. 183–188.
10. Анисимов М.М., Чайкина Е.Л., Соболевская М.П., Парская Н.С., Афиятуллоев Ш.Ш., Аминин Д.Л., Клыков А.Г. Влияние поликетидов из морского гриба *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 на урожайность и рост проростков ярового ячменя // Рос. с.-х. наука. 2018. № 4. С. 21–24.
11. Анисимов М.М., Чирва В.Я. О биологической роли тритерпеновых гликозидов // Успехи совр. биол. 1980. Т. 6, № 3. С. 351–364.
12. Анисимов М.М., Аминин Д.Л., Ровин Ю.Г., Лихацкая Г.Н., Попов А.М., Кузнецова Т.А., Калиновская Н.И., Еляков Г.Б. Об устойчивости клеток голотурии *Stichopus japonicus* к действию эндотоксина – стихопозида А // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270, № 4. С. 991–993.
13. Анисимов М.М., Прокофьева Н.Г., Киселева М.М., Агафонова И.Г., Агошкова О.В., Атопкина Л.Н., Уварова Н.И. Особенности противоопухолевого и мембранотропного действия 3- и 12-О-6-гликозидов 3-эпибетаулафолиентриола // Химиотерапия опухолей в СССР. 1987. Вып. 50. С. 154–158.
14. Анисимов М.М., Мартыас Е.А., Герасименко Н.И., Горовой П.Г. Противомикробная активность экстрактов и компонентов морских водорослей // Раст. ресурсы. 2012. Т. 48. С. 139–154.
15. Анисимов М.М., Мартыас Е.А., Чайкина Е.Л., Герасименко Н.И. Противомикробная, гемолитическая и фиторегулирующая активность липидных экстрактов из морских водорослей // Химия раст. сырья. 2010. Т. 4. С. 125–130.
16. Анисимов М.М. Тритерпеновые гликозиды и структурно-функциональные свойства мембран // Биол. науки. 1987. № 10. С. 49–63.
17. Анисимов М.М., Стригина Л.И., Горовой П.Г., Аминин Д.Л., Агафонова И.Г. Химический состав и медико-биологические свойства тритерпеновых гликозидов дальневосточного растения *Caulophyllum robustum* Maxim. (сем. Berberidaceae) // Раст. ресурсы. 2000. Т. 36, № 1. С. 107–129.
18. Ващенко А.П., Дега Л.А., Логачев В.В., Демина Е.А., Анисимов М.М. Рост и продуктивность растений сои при действии стимуляторов роста ДВ 47-4 и биостил // Сельхоз. биология. 2008. № 3. С. 110–114.
19. Гусев Е.И., Стоник В.А., Мартынов М.Ю., Гусева М.Р., Щукин И.А., Агафонова И.Г., Мищенко Н.П., Федорев С.А. Влияние гистохрома на динамику неврологических нарушений и МРТ-картины при экспериментальном геморрагическом инсульте // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2005. № 15. С. 61–66.
20. Демина Е.А., Шестак О.П., Новиков В.Л., Анисимов М.М. Рострегулирующее действие природных и синтетических 2-ацилциклопент-4-ен-1,3-диононов и их производных на проростки *Fagopyrum esculentum* // Химия раст. сырья. 2008. № 3. С. 107–110.
21. Закирова А.Е., Ануфриев В.Ф., Маханьков В.В., Дмитренко П.С., Агафонова И.Г. Изучение кардиопротекторных свойств 6-гидрокси-2,3-диглутатионил-7-этилнафтазарина на модели экспериментального инфаркта миокарда // Эксперим. и клин. фармакол. 2019. Т. 82, № 5. С. 14–19.

22. Карболина Е., Агафонова И., Сергеева И., Колосова Н. Гипоксия раннего возраста в развитии поведенческих дисфункций у крыс ускоренного старения OXYS и ее коррекция антиоксидантами // Успехи геронтологии. 2007. Т. 20, № 3. С. 46.
23. Кузнецова Т.А., Агафонова И.Г., Крохмаль Т.С., Звягинцева Т.Н., Филонова Н.В. Гепатопротекторные свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* // Тихоокеан. мед. журн. 2010. № 4 (42). С. 32–35.
24. Лихацкая Г.Н., Стригина Л.И., Попов А.М., Прокофьева Н.Г., Киселева М.И., Анисимов М.М. Действие стероидного гликозида полигонатозида С1 и его агликона пенногенина на опухолевые клетки, липосомы и бислойные липидные мембраны // Биол. мембраны. 1987. Т. 4, № 3. С. 290–297.
25. Лихацкая Г.Н., Яровая Т.П., Руднев В.С., Попов А.М., Анисимов М.М., Ровин Ю.Г. Образование комплекса тритерпенового гликозида голотурин А с холестерином в липосомальных мембранах // Биофизика. 1985. Т. 30, № 2. С. 358–359.
26. Лихацкая Г.Н. Тритерпеновые и стероидные гликозиды и мембраны // Молекулярные механизмы взаимодействия гликозидов с мембранами. Саарбрюккен: Lambert Acad. Publ. GmbH & Co., KG, 2011. С. 115.
27. Логачёв В.В., Губин Е.Н. Влияние нового удобрения ДВ-47-4 на продуктивность винограда сорта Цитронный Магарача // Виноградарство и виноделие. 2013. № 6. С. 2–5.
28. Лоенко Ю.Н. Биологическая активность и механизм действия биополимеров из морских организмов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Владивосток, 1999. 62 с.
29. Мартыяс Е.А., Герасименко Н.И., Бусарова Н.Г., Юрченко Е.А., Скрипцова А.В., Анисимов М.М. Биологическая активность липидов и фотосинтетических пигментов *Saccharina cichorioides* (Miyabe) (сем. Laminariaceae). Сезонные изменения активности // Химия раст. сырья. 2012. Т. 1. С. 97–105.
30. Менчикская Е.С., Аминин Д.Л., Сильченко А.С., Андриященко П.В., Авилов С.А., Калинин В.И., Стоник В.А. Средство, ингибирующее множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток: пат. 2494742 РФ. Заявл. 10.08.2012; опубл. 10.10.2013, Бюл. № 28.
31. Полоник С.Г., Прокофьева Н.Г., Агафонова И.Г., Уварова Н.И. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность s-ацетилгликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) // Хим.-фарм. журн. 2003. Т. 37, № 8. С. 3–4.
32. Попов А.М., Лихацкая Г.Н., Ровин Ю.Г., Анисимов М.М., Стригина Л.И. Дискретный характер проводимости бислойных липидных мембран в присутствии тритерпенового гликозида каулозида С // Биофизика. 1983. Т. 28, вып. 2. С. 351.
33. Попов А.М., Ровин Ю.Г., Лихацкая Г.Н., Руднев В.С., Анисимов М.М. Особенности действия тритерпенового гликозида голотурин А на бислойные липид-стериновые мембраны // Докл. АН СССР. 1982. Т. 264, № 4. С. 987–990.
34. Прокофьева Н.Г., Анисимов М.М., Стригина Л.И., Киселева М.И., Гафуров Ю.М. Влияние реакции среды на цитотоксическую и противоопухолевую активность тритерпенового гликозида каулозида С // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Черноголовка, 1987. С. 37.
35. Прокофьева Н.Г., Лихацкая Г.Н., Волкова О.В., Анисимов М.М., Киселева М.И., Ильин С.Г., Будина Т.А., Похило Н.Д. Действие бетулафолиентетраола на эритроцитарные и модельные мембраны // Биол. мембраны. 1992. Т. 9, № 9. С. 954–960.
36. Прокофьева Н.Г. Мембранотропная и противоопухолевая активность тритерпеновых гликозидов: автореф. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1989. 24 с.
37. Реунов А.В., Лапшина Л.А., Демина Е.А., Шестак О.П., Анисимов М.М., Новиков В.Л. Влияние циклопентановых β, β' -трикетонов на ультраструктуру меристематических клеток корневого чехлика проростков *Cucumis sativus* L. // Цитология. 2008. Т. 50, № 2. С. 147–153.
38. Стехова С.И., Анисимов М.М., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Похило Н.Д., Уварова Н.И. Связь между химическим строением и антистафилококковой активностью полиолов даммаранового ряда и их глюкозидов // Раст. ресурсы. 1998. Вып. 1. С. 51–56.
39. Стоник В.А., Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Гусева М.Р., Щукин И.А., Агафонова И.Г., Мищенко Н.П., Федорев С.А. Поиск веществ для лечения геморрагического инсульта. Использование магнитно-резонансной томографии в оценке эффективности гистохрома // Докл. АН. 2005. Т. 405, № 5. С. 696–698.
40. Стригина Л.И., Лихацкая Г.Н., Горовой П.Г. Стероидные гликозиды видов рода *Polygonatum* Mill. и их биологическая активность // Раст. ресурсы. 2003. Т. 39, № 3. С. 1–29.
41. Чайкина Е.Л., Дега Л.А., Пислягин Е.А., Анисимов М.М. Влияние водных экстрактов из морских водорослей на рост корней проростков сои (*Glucine max* (L.) Merr.) // Докл. РАСХН. 2014. № 6. С. 11–13.
42. Шенцова Е.Б., Анисимов М.М., Лоенко Ю.Н., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Уварова Н.И. Влияние гликозидов бетулафолиентриола и его 3-эпимера на рост опухолевых клеток *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34, № 11. С. 831–833.
43. Щеглов В.В., Баранова С.И., Анисимов М.М., Антонов А.С., Афиятуллоев Ш.Ш., Левина Э.В., Шарыпов В.Ф., Стоник В.А., Еляков Г.Б. Изучение антимикробного спектра действия некоторых тритерпеновых и стероидных гликозидов // Антибиотики. 1979. № 4. С. 270–273.
44. Юрченко Е.А., Анисимов М.М. Рост и продуктивность перца сладкого *Capsicum annum* L. при обработке препаратом ДВ 47-4 // Сельхоз. биология. 2011. № 5. С. 113–117.
45. Юрченко Е.А. Циклопентановые β, β' -трикетоны. Новый класс регуляторов роста растений. Саарбрюккен: Lambert Acad. Publ. GmbH & Co., KG, 2010. 132 с.

46. Agafonova I.G., Stonik V.A., Kotelnikov V.N., Geltser B.I., Kolosova N.G. Assessment of combined therapy of histocholesterol and nebulal as angioprotectors on the background of experimental hypertension by magnetic resonance angiography // *Appl. Magn. Reson.* 2018. Vol. 49, N 2. P. 217–225.
47. Agafonova I.G., Stonik V.A., Kotelnikov V.N., Kolosova N.G. Comparative study on hypertension-induced cerebral vascular alterations in two rat lines by MR Angiography // *Appl. Magn. Reson.* 2012. Vol. 42, N 4. P. 487–497.
48. Agafonova I.G., Radchenko O.S., Novikov V.L., Aminin D.L., Stonik V.A. Magnetic resonance imaging of mouse Ehrlich carcinoma growth inhibition by thiocarpine, an analogue of cytotoxic marine alkaloid polycarpine // *Magn. Reson. Imaging.* 2008. Vol. 26, N 6. P. 763–769.
49. Agafonova I.G., Moskovkina T.V. Studies on anti-inflammatory action of tryptanthrin, using a model of DSS-induced colitis of mice and magnetic resonance imaging // *Appl. Magn. Reson.* 2015. Vol. 46, N 7. P. 781–791.
50. Agafonova I.G., Anufriev V.P. The effect of hydroxynaphthazarin derivatives on decrease of ischemic area after damage focal cerebral blood circulation // *Appl. Magn. Reson.* 2017. Vol. 48, N 6. P. 579–587.
51. Agafonova I.G., Stonik V.A., Kotelnikov V.N., Geltser B.I., Kolosova N.G. The morpho-functional characteristics of cerebral and renal arteries after induced arterial hypertension in rats using magnetic resonance imaging // *Appl. Magn. Reson.* 2017. Vol. 48, N 9. P. 911–919.
52. Agafonova I.G., Kotelnikov V.N., Eichhoff U. Vasodilatation function of cerebral vessels at arterial hypertension in oxys rats // *Appl. Magn. Reson.* 2014. Vol. 45, N 6. P. 527–536.
53. Aminin D.L., Menchinskaya E.S., Pislugin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // *Mar. Drugs.* 2015. N 13. P. 1202–1223.
54. Aminin D.L., Anisimov M.M. Biological function of holotoxins in body of holothurian *Stichopus japonicus* // *Recent advances in toxinology research. Vol. 2* / eds P. Gopalakrishnakone, C.K. Tan. Singapore: Venom and Toxin Res. Group, Nat. Univ., 1992. P. 562–575.
55. Aminin D., Pislugin E., Astashev M., Es'kov A., Kozhemyako V., Avilov S., Zelepuga E., Yurchenko E., Kaluzhskiy L., Kozlovskaya E., Ivanov A., Stonik V. Glycosides from edible sea cucumbers stimulate macrophages via purinergic receptors // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, N 39683.
56. Aminin D.L., Koy C., Dmitrenko P.S., Müller-Hilke B., Koczan D., Arbogast B., Silchenko A.S., Kalinin V.I., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Thiesen H.J., Deinzer M.L., Glocker M.O. Immunomodulatory effects of holothurian triterpene glycosides on mammalian splenocytes determined by mass spectrometric proteome analysis // *J. Proteomics.* 2009. Vol. 72, N 5. P. 886–906.
57. 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. Immunomodulatory properties of cumaside // *Int. Immunopharmacol.* 2006. Vol. 6, N 7. P. 1070–1082.
58. Aminin D.L., Gorpenchenko T.Y., Bulgakov V.P., Andryashchenko P.V., Avilov S.A., Kalinin V.I. Triterpene glycoside cucumarioside A₂-2 from sea cucumber stimulates mouse immune cell adhesion, spreading and motility // *J. Med. Food.* 2011. Vol. 14, N 6. P. 594–600.
59. Anisimov M.M., Cirva V.J. Die biologische Bewertung von Triterpenglykosiden // *Pharmazie.* 1980. Vol. 35, N 12. P. 731–738.
60. Anisimov M.M., Chaikina E.L., Klykov A.G., Rasskazov V.A. Effect of seaweeds extracts on the growth of seedling roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) is depended on the season of algae collection // *Agric. Sci. Develop.* 2013. Vol. 2, N 8. P. 67–75.
61. Anisimov M.M., Chaikina E.L. Effect of seaweed extracts on the growth of seedling roots of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Seasonal changes in the activity // *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* 2014. Vol. 2, N 3. P. 19–23.
62. Anisimov M.M., Skriptsova A.V., Chaikina E.L., Klykov A.G. Effect of water extracts of seaweeds on the growth of seedling roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) // *Int. J. Res. Rev. Appl. Sci.* 2013. Vol. 16, N 2. P. 282–287.
63. Anisimov M.M., Klykov A.G. Metabolites of terrestrial plants and marine organisms as potential regulators of growth of agricultural plants in the Russian Far East // *Int. J. Agric. Sci.* 2014. Vol. 6, N 11. P. 88–102.
64. Chaikina E.L., Utkina N.K., Anisimov M.M. Influence of merosesquiterpenoids from marine sponges on seedling root growth of agricultural plants // *Nat. Prod. Commun.* 2016. Vol. 11, N 1. P. 11–13.
65. Chaikina E.L., Sobolevskaya M.P., Afiyatulloev Sh.Sh., Aminin D.L., Anisimov M.M. Pallidopenillines: polyketides from the alga-derived fungus *Penicillium thomii* Maire KMM 4675 as stimulators of the initial stages of crop plant development // *Nat. Prod. Commun.* 2017. Vol. 12, N 6. P. 883–884.
66. Chingizova E.A., Skriptsova A.V., Anisimov M.M., Aminin D.L. Antimicrobial activity of marine algal extracts // *Int. J. Phytomedicine.* 2017. N 9. P. 113–122.
67. Dyshlovoy S.A., Menchinskaya E.S., Venz S., Rast S., Amann K., Hauschild J., Otte K., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Alsdorf W., Madanchi R., Bokemeyer C., Schumacher U., Walther R., Aminin D.L., Fedorov S.N., Shubina L.K., Stonik V.A., Balabanov S., Honecker F. von Amsberg G. The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity *in vitro* and *in vivo* in prostate cancer // *Int. J. Cancer.* 2016. Vol. 138, N 10. P. 2450–2465.
68. Fedorov S.N., Radchenko O.S., Shubina L.K., Balaneva N.N., Agafonova I.G., Stonik V.A., Bode A.M., Dong Z., Jin J.-O., Kwak J.-Y. Anticancer activity of 3-demethylubiquinone Q2. *In vivo* experiments and probable mechanism of action // *Anticancer Res.* 2008. Vol. 28, N 2A. P. 927–932.

69. Klykov A.G., Anisimov M.M., Moiseenko L.M., Chaikina E.L., Parskaya N.S. Effect of biologically active substances on morphological characteristics, rutin content and productivity of *Fagopyrum esculentum* Moench. // Agric. Sci. Develop. 2014. Vol. 3, N 1. P. 139–142.
70. Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Kovalchik S.N., Davydova V.N., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Aminin D.L. Antitumor activity of cucumarioside A₂-2 // Chemotherapy. 2013. N 59. P. 181–191.
71. Menchinskaya E.S., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Andryjashchenko P.V., Kalinin V.I., Stonik V.A. Inhibition of tumor cells multidrug resistance by cucumarioside A₂-2, frondoside A and their complexes with a cholesterol // Nat. Prod. Commun. 2013. Vol. 8, N 10. P. 1377–1380.
72. Pisyagin E.A., Manzhulo I.V., Dmitrenok P.S., Aminin D.L. Cucumarioside A₂-2 causes changes in the morphology and proliferative activity in mouse spleen // Acta Histochemica. 2016. N 118. P. 387–392.
73. Pisyagin E.A., Manzhulo I.V., Gorpenchenko T.Y., Dmitrenok P.S., Avilov S.A., Silchenko A.S., Wang Y-M., Aminin D.L. Cucumarioside A₂-2 Causes Macrophage Activation in Mouse Spleen // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, N 11. P. 341.
74. Pisyagin E.A., Dmitrenok P.S., Gorpenchenko T.Y., Avilov S.A., Silchenko A.S., Aminin D.L. Determination of cucumarioside A₂-2 in mouse spleen by radiospectroscopy, MALDI-MS and MALDI-IMS // Eur. J. Pharm. Sci. 2013. Vol. 49, N 4. P. 461–467.

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 A₁, белка-шаперона Skp; полисахаридов красных водорослей – каррагинанов; хитозана и полиэлектролитных комплексов хитозан–каррагинан.

Ключевые слова: белки наружной мембраны, порины, фосфолипаза A₁, 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'eva (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 A₁ 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 β -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 A₁ (PldA—detergent-resistant phospholipase A₁, ген *pldA*) является уникальным интегральным мембранным ферментом, найденным в грамтрицательных 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 A₁ 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 A₁ *Y. pseudotuberculosis* позволили установить функционально важные остатки фермента и выявить структурные различия с фосфолипазой A₁ *E. coli*. Показано, что фосфолипаза A1 *Y. pseudotuberculosis* в силу своей локализации на поверхности клетки не только является одним из факторов вирулентности грамтрицательных 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 A₁. 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 β-(1→4) и α-(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- α 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 ζ -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 ζ -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 (κ -КН) с различным соотношением исходных компонентов показало, что комплексы κ -КН с избытком поликатиона представляют собой положительно заряженные частицы, стабилизированные свободными аминогруппами хитозана, расположенными на поверхности волокон κ -КН. При формировании отрицательно заряженных комплексов с преобладанием полианиона хитозан встраивается в сетчатую структуру κ -КН и вызывает ее разукрупнение. Комплексы с высоким содержанием κ -КН ингибируют формирование биопленок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [43].

Водорастворимый комплекс, созданный на основе κ -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 (κ / β -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 ζ -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., Конышев 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 эндотоксемии 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 // Бюл. 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., Шкуратов 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 κ/β -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., Terent'eva 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.

И.В. ЧИКАЛОВЕЦ, В.И. МОЛЧАНОВА, Т.О. МИЗГИНА,
А.П. ФИЛЬШТЕЙН, П.А. ЛУКЬЯНОВ, О.В. ЧЕРНИКОВ

Углеводсвязывающие белки и полисахариды морских гидробионтов

Морские организмы являются перспективным объектом для выделения биологически активных соединений. В лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН в течение ряда лет проводятся исследования по выделению лектинов и полисахаридов из морских гидробионтов, изучаются их структуры, физико-химические свойства и биологическая активность. Из двустворчатых моллюсков были выделены лектины, обладающие иммуностимулирующей, антибактериальной и противоопухолевой активностью. Установлено, что они принимают участие во врожденном иммунитете моллюсков. Выделены и охарактеризованы полисахариды неомитилан и кораллан, проявляющие иммуностимулирующее действие, которое усиливается при получении низкомолекулярных фрагментов полисахаридов.

Ключевые слова: лектины, полисахариды, морские беспозвоночные, биологическая активность.

Carbohydrate-binding proteins and polysaccharides of marine hydrobionts. I.V. CHIKALOVETS^{1, 2}, V.I. MOLCHANOVA¹, T.O. MIZGINA^{1, 2}, A.P. FILSHEIN¹, P.A. LUKYANOV¹, O.V. CHERNIKOV¹ (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok).

Marine organisms are a promising object for the isolation of biologically active compounds. For a number of years, studies have been conducted at the Laboratory of Chemistry of Non-Infectious Immunity of the PIBOC FEB RAS for the isolation of lectins and polysaccharides from marine hydrobionts. Its structure, study of the physicochemical properties and biological activity have been studied. Lectins possessing immunostimulating, antibacterial and antitumor activities were isolated from bivalve mollusks. It was established that they are involved in the innate immunity of mollusks. Neomitilane and corallan polysaccharides were isolated and characterized, exhibiting an immunostimulating effect, enhancing upon receipt of low molecular weight fragments.

Key words: lectins, polysaccharides, marine invertebrates, biological activity.

Соединения, выделенные из морских биологических источников (цианобактерий, водорослей, беспозвоночных животных и рыб), представляют большой интерес как потенциальные биоактивные вещества. Благодаря фармакологическим свойствам они нашли применение в фармацевтической индустрии и производятся в качестве пищевых компонентов. Проводятся дальнейшие исследования этих соединений с целью разработки новых противовирусных, антимикробных, противоопухолевых и противовоспалительных лекарств [23, 24].

ЧИКАЛОВЕЦ Ирина Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), МОЛЧАНОВА Валентина Ильинична – кандидат химических наук, старший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), МИЗГИНА Татьяна Олеговна – младший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), ФИЛЬШТЕЙН Алина Петровна – младший научный сотрудник, ЛУКЬЯНОВ Павел Александрович – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, *ЧЕРНИКОВ Олег Викторович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: chernikov@piboc.dvo.ru

В течение ряда лет в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН проводятся исследования по выделению лектинов и полисахаридов, изучаются их структуры, физико-химические свойства и биологическая активность.

Лектины – это белки или гликопротеины неиммунной природы, специфически и обратимо связывающие моно- и олигосахариды [22]. Будучи открытыми более 100 лет назад, они оказались в центре внимания биологов только в последние годы, когда было показано, что углеводбелковое взаимодействие является важным механизмом передачи биологической информации на уровне клетки. Лиганды лектинов – углеводы, формируют гликокаликс клетки, который играет огромную роль в процессе жизнедеятельности организма. Быстрое развитие исследований в области гликобиологии позволило выявить ключевую роль лектинов в межклеточных взаимодействиях, что резко увеличило интерес к ним. В настоящее время масштабы этих исследований и их характер таковы, что можно говорить о самостоятельной области науки – лектинологии [17]. Через углеводбелковое узнавание осуществляются такие важные биологические процессы, как оплодотворение, проникновение инфекции в клетки хозяина, миграция лейкоцитов к месту воспаления, а также процессы малигнизации и метастазирования. Благодаря способности распознавать углеводные структуры на поверхности клеток, а также влиять на клеточные процессы лектины нашли широкое применение в биологии и медицине. Они используются для анализа групп крови, выделения определенного типа клеток, например незрелых форм лимфоцитов при трансплантации костного мозга, применяются для очистки биологических жидкостей [21]. Известно, что некоторые патологические процессы, такие как неопластическая трансформация, сопровождаются изменением гликозилирования и экспрессией на поверхности опухолевых клеток углеводных маркеров малигнизации. Такие специфические углеводные детерминанты могут быть выявлены с помощью лектинов. Это позволяет использовать их как инструмент для изучения механизмов малигнизации и в практической онкологии для ранней и дифференциальной диагностики заболевания [4].

На сегодняшний день присутствие лектинов обнаружено в различных тканях (лимфе, слизи поверхности тела, гонадах и др.) у более 300 видов морских беспозвоночных (кишечнополостных, членистоногих, иглокожих, хордовых и др.). В результате исследований сотрудниками лаборатории было открыто несколько новых лектинов, обладающих широким спектром биологической активности – антибактериальной, цитокиностимулирующей, анти-ВИЧ [1, 10, 20], найдены источники лектинов среди наиболее распространенных промысловых видов мидий семейства *Mytilidae*, которые имеют обширный ареал обитания и являются одним из важнейших объектов марикультуры, выделены Gal/GalNAc-специфичные лектины из мидий *Crenomytilus graynus* (CGL) [6] и *Mytilus trossulus* (MTL) [14]. Из мускула гребешка *Patinopecten yessoensis* был выделен Gal/GalNAc-специфичный лектин (PYL) [13], а из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*, образующего промысловые скопления, – маннанспецифичный лектин (GYLman).

Первичная структура и филогенетический анализ показали, что CGL не относится ни к одному из известных на сегодняшний день классов лектинов [19] и проявляет высокую степень гомологии (88 %) только с MTL [12] и лектином из мидии *Mytilus galloprovincialis* (MytiLec), выделенным японскими учеными [16]. При установлении тонкой углеводной специфичности CGL [9] методом микроанализа на гликочипах было изучено связывание CGL с более чем 600 углеводными структурами. Оказалось, что лектин, также как и MytiLec, взаимодействует только с Gal и GalNAc на невозстанавливаемом конце углеводной цепи лигандов. При этом связывание с α -аномерами оказалось более сильным, чем с β -аномерами. Анализ наиболее распространенных мотивов гликанов для CGL показал высокое сродство к структуре Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, сходной с глоботрезозой (Gb3:Gal α 1-4Gal β 1-4Glc), эпитопом глоботриазилцерамида. Мы выявили, что CGL распознает Gb3 на поверхности клеток Raji лимфомы Беркитта, отличающиеся высокой экспрессией Gb3, что приводит к дозозависимому цитотоксическому эффекту, аресту клеточного цикла в фазе G2/M и апоптозу. Лектин не влияет на клетки эритролейкемии K562,

которые не экспрессируют Gb3. Активность CGL ингибируют α -галактозиды [9]. Наши результаты предполагают, что CGL имеют потенциал для использования в диагностике и лечении рака. На основании полученных кристаллических структур CGL и MytiLec показано, что их мультивалентные димерные формы являются критическими для цитотоксического эффекта.

Повсеместное присутствие лектинов в природе и их способность различать близкие по структуре углеводы в растворе и на клеточной поверхности обеспечивают неослабевающий интерес исследователей к изучению их биологических функций.

Функциональную роль CGL, MTL, GYLman и PYL устанавливали, определяя их уровень после иммунизации животных бактериями *Vibrio proteolyticus*, изолированными из мест обитания моллюсков. Во всех случаях наблюдалось изменение содержания лектинов в ответ на бактериальное заражение, что позволяет предположить их участие в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов. Интересные результаты были получены при иммунизации моллюсков *G. yessoensis* суспензией дрожжей *Pichia pastoris* с одновременным выдерживанием их в аквариумах с дизельным топливом. Уровень лектина через двое суток увеличился в 15 раз по сравнению с исходным уровнем, в то время как в группе с добавлением только дизельного топлива он возрос в 7,5 раз, а с *P. pastoris* – в 5 раз. Моллюски, будучи придонными фильтраторами, являются биоиндикаторами загрязнения. Мидии, к примеру, выбраны в качестве объекта для международных программ мониторинга прибрежных вод. Поэтому лектины, такие как GYLman, могут служить маркерами загрязнения морской среды.

Морские организмы находятся в постоянном контакте с окружающей средой, содержащей высокую концентрацию патогенных грибов, бактерий и вирусов. Распознавание углеводных детерминант на поверхности патогена играет важную роль в системе защитных реакций врожденного иммунитета различных групп животных. В настоящее время углеводраспознающие рецепторы, равно как и сквенджер- и толлподобные рецепторы, относят к группе паттернраспознающих молекул, которые связываются со специфическими молекулярными паттернами (известны как ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны, или ПАМП) определенных микроорганизмов. Лектины, взаимодействующие с ПАМП, объединяют в группу, получившую название паттернраспознающие рецепторы (ПРР) [11]. Для определения принадлежности наших лектинов к таким рецепторам была изучена их способность связываться с основными видами ПАМП – ЛПС, пептидогликаном, β -1,3-глюканом (рис. 1).

CGL предпочтительней взаимодействовал с ЛПС, а MTL – с пептидогликаном, что обусловлено различием в углеводсвязывающих сайтах этих лектинов. Результаты связывания

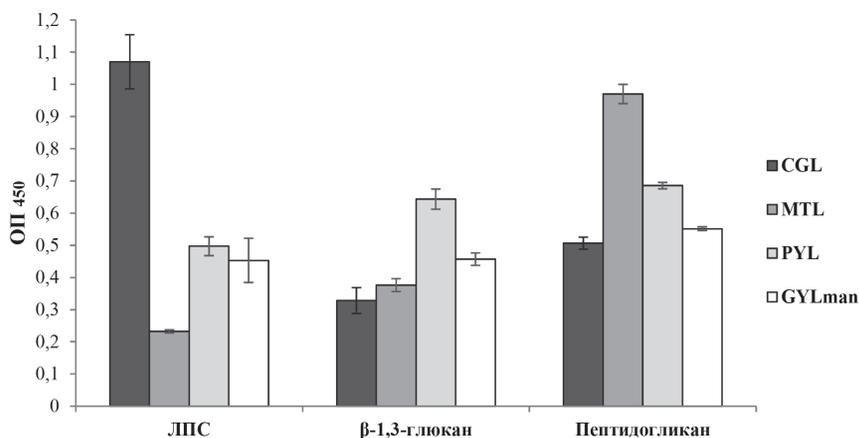


Рис. 1. Связывающая активность лектинов с различными ПАМП, определенная методом твердофазного лектинферментного анализа и измеренная при 450 нм

лектинов непосредственно с микробиальными клетками представлены в табл. 1.

Таблица 1

Антибактериальная и антифунгальная активность лектинов

Микроорганизм	Связывающая активность*			
	CGL	MTL	PYL	GYLman
<i>Candida albicans</i>	0,65 ± 0,01	0,44 ± 0,05	0,74 ± 0,09	0,69 ± 0,03
<i>Vibrio proteolyticus</i>	1,42 ± 0,04	0,37 ± 0,14	0,68 ± 0,11	0,64 ± 0,01
<i>Escherichia coli</i>	1,63 ± 0,09	0,48 ± 0,06	0,98 ± 0,04	1,55 ± 0,01
<i>Bacillus subtilis</i>	0,74 ± 0,07	0,26 ± 0,07	0,53 ± 0,06	0,55 ± 0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,39 ± 0,06	0,49 ± 0,01	0,66 ± 0,08	0,69 ± 0,01

* Связывающая активность определена методом твердофазного лектинферментного анализа и измерена при длине волны 450 нм.

Все лектины связывались как с грамположительными, так и с грамотрицательными бактериями, подтверждая, таким образом, вывод, что ведущая роль в системе защиты беспозвоночных от микробного вторжения отводится лектинам, которые обладают способностью агглютинировать различные микроорганизмы, лишая последних способности дальнейшего рассеивания и внедрения в ткани.

Лектины из морских источников благодаря их способности узнавать гликопротеины, гликолипиды, протеогликаны и бактериальные липополисахариды определенных клеточных типов участвуют в физиологических и патологических процессах, включая взаимодействие между хозяином и патогеном, межклеточные коммуникации, доставку белков и защиту от внешних патогенов [17]. Такое поведение делает их пригодными для диагностики и терапии, открывая, таким образом, новое направление для поиска и создания лекарств.

Не менее перспективное направление в создании биологически активных соединений – поиск и выделение полисахаридов из морских гидробионтов. На основе современных знаний и результатов наших более ранних исследований полисахаридов из различных видов морских организмов, обитающих в различных районах Мирового океана, были получены данные, подтверждающие, что общим свойством морских беспозвоночных является продуцирование ими биогликанов (полисахаридов и гликоконъюгатов) с различной химической структурой. Они присутствуют в виде гомогликанов с различными типами гликозидных связей и гетерогликанов, сульфатированных или несulfатированных. Такие гликаны иногда связаны с белком в виде полисахаридбелковых комплексов.

В последние несколько десятилетий биологическая активность полисахаридов привлекает все больше внимания в биохимии и медицине. Наиболее перспективными биофармакологическими активностями этих биомолекул считаются их иммуномодулирующее и противоопухолевое действия. Многочисленные сообщения указывают на то, что большинство полисахаридов или полисахаридбелковых комплексов из морских источников не имеют прямого цитотоксического влияния на опухолевые клетки. Противоопухолевое действие они оказывают преимущественно опосредованно. Возможно, в некоторых случаях эти два типа ингибирующих действия могут проявляться одновременно [8].

Из мидии *Crenomytilus grayanus* нами выделен биогликан – неомитилан, являющийся разветвленным гликогеноподобным 1,6-, 1,4- α -D-глюканом с молекулярной массой 2×10^6 кДа, изучены его физико-химические и биологические свойства. Показано, что неомитилан обладает противовоспалительным, ранозаживляющим, радиозащитным и иммуномодулирующим действием и может стимулировать образование активных форм кислорода (АФК) в перитонеальных макрофагах. Кроме того, он стимулирует фагоцитоз перитонеальных макрофагов интактных мышей *in vitro* и индуцирует синтез провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6 и ИФН- γ [2, 5, 15]. Однако высокая молекулярная масса и сильная вязкость растворов многих полисахаридов из морских ресурсов ограничивают их фармацевтическое применение. Из-за высокой молекулярной массы и пониженной

растворимости в воде нативные полисахариды обычно плохо усваиваются и обладают низкой биологической активностью. Кроме того, полисахариды с высокой молекулярной массой, непосредственно вводимые в организм, могут быть токсичными, что ограничивает их применение. Следовательно, олигосахариды или фрагменты полисахаридов с низкой молекулярной массой, полученные посредством химической или ферментативной деградации, могут быть использованы для снижения иммуногенности и повышения биологической активности. Химические модификации полисахаридов дают возможность получить новые фармакологические средства с потенциальным терапевтическим эффектом.

Для получения низкомолекулярных фрагментов неомитилан был подвергнут последовательной кислотной и ферментативной обработке, моделирующей условия желудочно-кишечного тракта. В результате было получено несколько фрагментов с молекулярной массой >100, >10, >1 и <1 кДа. Химический анализ и ¹³C ЯМР-спектроскопия фрагментов неомитилана с молекулярной массой >100 и >10 кДа показали, что только некоторые гликозидные связи были расщеплены без разрушения основной углеводной цепи полисахарида. Фрагменты неомитилана с массой >1 и <1 кДа содержали в своем составе глюкозу и мальтоолигосахариды и из-за малых количеств в дальнейшем не изучались.

Проведено сравнительное исследование некоторых иммуностимулирующих свойств исходного неомитилана и его фрагментов, в частности цитокиностимулирующей и лизосомальной активности. Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма и осуществляющих взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом. Уровни содержания цитокинов отражают текущее состояние иммунной системы и развитие иммунного ответа [3].

Цитокиностимулирующую активность неомитилана и его фрагментов с молекулярной массой >100 и >10 кДа изучали на клетках периферической крови человека. Было исследовано влияние полисахаридов на спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных (ФНО-α, ИФН-γ) и противовоспалительных (ИЛ-10, ИЛ-4) цитокинов. Для индукции синтеза цитокинов использовали липополисахарид клеточной стенки *E. coli*. В табл. 2 представлены результаты синтеза цитокинов клетками крови под действием полисахаридов по сравнению с контрольными клетками.

Таблица 2

Влияние неомитилана и его фрагментов на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов

Образец	Концентрация, мкг/мл	Увеличение продукции цитокинов, %					
		ФНО-α	ФНО-α (с ЛПС)	ИФН-γ	ИФН-γ (с ЛПС)	ИЛ-10	ИЛ-10 (с ЛПС)
Неомитилан	100	4501,15	-6,26	5,23	-4,93	68,81	13,09
	10	717,73	-12,06	-79,68	36,61	220,17	-2,65
Фрагменты с молекулярной массой							
>100 кДа	100	8067,41	22,28	178,85	14,78	1773,54	59,66
	10	7505,51	2,14	120,97	40,84	226,47	36,16
>10 кДа	100	22 174,17	14,23	452,43	56,33	2013,21	67,67
	10	1024,88	-10,15	-31,66	35,20	-25,50	38,06

Как видно из табл. 2, фрагменты неомитилана в концентрации 100 и 10 мкг/мл оказывали стимулирующее воздействие на спонтанную продукцию ФНО-α. Особенно это заметно в случае спонтанной продукции цитокина. С уменьшением молекулярной массы полисахарида происходит увеличение его синтеза, образец с массой >10 кДа оказался наиболее активным. В случае индуцированной продукции цитокина при концентрации 10 мкг/мл неомитилан и его фрагменты несколько снижают сверхэкспрессию цитокина, проявляя таким образом иммуномодулирующий эффект. Такая же закономерность прослеживается при стимуляции синтеза ИФН-γ фрагментами неомитилана. В отличие от нативного полисахарида в концентрации 100 мкг/мл, также наблюдается увеличение синтеза

цитокина с уменьшением молекулярной массы. Уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 увеличивался под действием неомитилана и его фрагментов, особенно в концентрации 100 мкг/мл, в то время как на индукцию другого противовоспалительного цитокина ИЛ-4 они не оказывали заметного влияния (данные не представлены). Таким образом, показано, что неомитилан, а также его низкомолекулярные фрагменты оказывают влияние на продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что позволяет говорить об их иммуностимулирующей активности.

Еще одним важным паттерном иммуностимулирующей активности биологически активных веществ является их влияние на функции фагоцитарных клеток, в частности на активность лизосомальных ферментов перитонеальных макрофагов мыши. Макрофаги представляют собой значительную популяцию клеток в системе защиты хозяина. Они служат основным компонентом неспецифического клеточного иммунного ответа, а также тесно вовлечены в специфический иммунитет. Макрофаги поглощают инфекционные микроорганизмы и переваривают их с помощью лизосомальных ферментов [18].

Используя технику окрашивания лизосом флуорохромами с последующим анализом изображений клеток, мы обнаружили, что неомитилан и его фрагменты (>100 и >10 кДа) на четвертые сутки после внутрибрюшинного введения тестируемых препаратов в дозе 300 мкг/мышь достоверно стимулировали лизосомальную активность перитонеальных макрофагов в экспериментах *in vivo* (рис. 2).

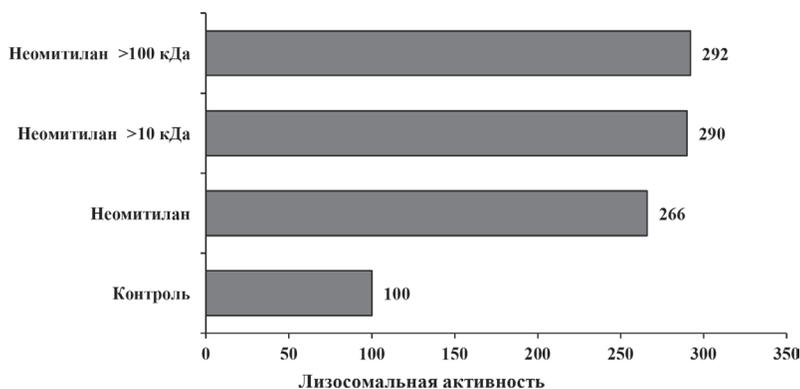


Рис. 2. Влияние неомитилана и его фрагментов на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши. Лизосомальную активность рассчитывали, принимая за 100 % активность макрофагов контрольной группы мышей

Показано, что действие неомитилана на лизосомальную активность макрофагов сопровождалось стимуляцией лизосомальной активности более чем в 2,5 раза по сравнению с контрольным уровнем, что выражалось в увеличении количества, размера и кислотности лизосом, тогда как фрагменты неомитилана в той же дозе вызывали увеличение активности примерно в 3 раза по сравнению с активностью макрофагов контрольной группы мышей.

Еще одним объектом нашего исследования стал протеогликан (кораллан), выделенный из мягкого коралла *Pseudopterogorgia americana*, широко распространенного в водах Карибского бассейна. В литературе имеется ограниченная информация о выделении и изучении высокомолекулярных углеводов из кораллов. Слизь – основной секреторный продукт кораллов, как твердых (*Scleractinia*), так и мягких (*Acyonacea*). Она представляет собой пограничный слой между мягкими тканями животного и внешней средой. Биохимический анализ различных видов коралловой слизи показал, что ее состав варьируется и состоит из белка, липидов и полисахаридов в различных соотношениях [7]. Изучение основных физико-химических характеристик кораллана показало, что он является кислым углевод-белковым соединением. Содержание углеводов в его составе достигает 46,7 %,

белка – 15,1 %. Углеводный компонент кораллана представляет собой сульфатированный гликуроногликан.

Кораллан обладает высокой физиологической активностью, в частности способностью стимулировать иммунную систему против различных заболеваний. Достоверно известно, например, что он вызывает торможение роста 6 из 10 изученных злокачественных опухолей (от 52 до 94 %) при внутрибрюшинном и 2 опухолей при пероральном методе введения. Это соединение неэффективно при саркоме-180, но высокоактивно в отношении таких резистентных опухолей, как рак легкого (Льюис LLC) и аденокарцинома толстого кишечника (Акатол).

Кроме противоопухолевой активности кораллан проявляет иммуностимулирующую активность. Он стимулирует иммуногенез животных при псевдотуберкулезной инфекции: 1) усиливает фагоцитарную активность лейкоцитов крови; 2) в 3–4 раза по сравнению с контролем увеличивает количество антителобразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана; 3) в 2 раза повышает продолжительность жизни и выживаемость мышей, зараженных смертельной дозой возбудителя псевдотуберкулеза. Таким образом, кораллан может быть использован для стимуляции защитных сил организма при псевдотуберкулезной инфекции. В концентрациях от 10 до 500 мкг/мл *in vitro* он индуцирует продукцию интерферона в лейкоцитах человека. В то же время внутривенное введение кораллана в высоких дозах в силу особенностей его макромолекулярной структуры вызывает у мышей анафилактическую реакцию. Этот эффект исчезает после ультразвуковой и ферментативной обработки кораллана с сохранением его иммуномодулирующих свойств.

Таким образом, получение низкомолекулярных фрагментов как неомитилана, так и кораллана является перспективным направлением для создания препаратов, обладающих высокой биологической активностью и не вызывающих негативных последствий при пероральном введении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукьянов П.А., Черников О.В., Кобелев С.С., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Ли В. Углеводсвязывающие белки морских беспозвоночных // Биоорг. химия. 2007. Т. 33, № 1. С. 172–181.
2. Молчанова В.И., Чикаловец И.В., Черников О.В., Попов А.М., Кривошапко О.Н., Лукьянов П.А. Сравнительное изучение биологической активности биогликанов из дальневосточной мидии *Crenomytilus grayanus* // ТМЖ. 2012. № 1. С. 47–50.
3. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. 2002. № 1. С. 9–17.
4. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Булгаков А.А., Черников О.В., Петрова И.Ю., Лукьянов П.А. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека // Вестн. ДВО РАН. 2010. № 5. С. 125–130.
5. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Аминин Д.Л., Черников О.В., Пислягин Е.А., Лукьянов П.А. Неомитилан – новый иммуномодулятор из мидии *Crenomytilus grayanus* // ТМЖ. 2009. № 3. С. 32–35.
6. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V., Skobun A.S., Glazkova V.E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1998. Vol. 119. P. 45–50.
7. Brown B., Bythell J. Perspectives on mucus secretion in reef corals // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2005. Vol. 296. P. 291–309.
8. Cheong K.L., Xia L.X., Liu Y. Isolation and Characterization of Polysaccharides from Oysters (*Crassostrea gigas*) with Anti-Tumor Activities Using an Aqueous Two-Phase System // Mar. Drugs. 2017. Vol. 15, N 11. P. 338–349.
9. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., Molchanova V., Hua K.F. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan // Int. J. Biol. Macromol. 2017. Vol. 104. P. 508–514.
10. Chernikov O.V., Molchanova V.I., Chikalovets I.V., Kondrashina A.S., Li W., Lukyanov P.A. Lectins of marine hydrobionts // Biochemistry (Moscow). 2013. Vol. 78, N 7. P. 760–770.
11. Cheung R.C., Wong J.H., Pan W., Chan Y.S., Yin C., Dan X., Ng T.B. Marine lectins and their medicinal applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 99. P. 3755–3773.

12. Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Litovchenko A.P., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 50. P. 27–33.
13. Chikalovets I.V., Mizgina T.O., Molchanova V.I., Ovcharenko Yu.S., Chernikov O.V. Isolation and characterization of lectin from the scallop *Patinopecten yessoensis* // *Chem. Nat. Comp.* 2017. Vol. 53, N 4. P. 717–721.
14. Chikalovets I.V., Kondrashina A.S., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Lukyanov P.A. Isolation and general characteristics of lectin from the mussel *Mytilus trossulus* // *Chem. Nat. Comp.* 2013. Vol. 48, N 6. P. 1058–1061.
15. Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Chernikov O.V., Lukyanov P.A. Preparation of neomytilan, a bioglycan from the mussel *Crenomytilus grayanus*, and its immunostimulating activity // *Chem. Nat. Comp.* 2013. Vol. 49, N 5. P. 789–793.
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. A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287, N 53. P. 44772–44783.
17. Gabius H.-J. The history of lectinology // *Antitumor potential and other emerging medicinal properties of natural compounds* / eds E.F. Fang, T.B. Ng. Dordrecht: Springer, 2013. P. 15–20.
18. Jeong S.-Ch., Yang B.-K., Kim G.-N., Jeong H., Wilson M.A., Cho Y., Sundar Rao K., Song Ch.-H. Macrophage-Stimulating Activity of Polysaccharides Extracted from Fruiting Bodies of *Coriolus versicolor* (Turkey Tail Mushroom) // *J. Med. Food.* 2006. Vol. 9, N 2. P. 175–181.
19. Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A., Lukyanov P.A. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35. P. 1320–1324.
20. Molchanova V., Chernikov O., Chikalovets I., Lukyanov P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr. (Rhodophyta) // *Bot. Mar.* 2010. Vol. 53. P. 69–78.
21. Naeem A., Saleemuddin M., Khan R.H. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2007. Vol. 8, N 3. P. 261–271.
22. Sharon N., Lis H. *Lectins*: 2nd ed. Dordrecht: Springer, 2007. 454 p.
23. Smith V.J., Desbois A.P., Dyrinda E.A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae // *Mar. Drugs.* 2010. Vol. 8. P. 1213–1262.
24. Vo T.S., Kim S.K. Potential anti-HIV agents from marine resources: A overview // *Mar. Drugs.* 2010. Vol. 8. P. 2871–2892.

Л.А. БАЛАБАНОВА, М.П. ИСАЕВА

Морская биохимия: достижения и перспективы структурно- функционального исследования генов и геномов морских организмов

Приведены результаты исследований генов морского генеза с использованием геномных и генно-инженерных технологий. Даны примеры изучения биополимеров и усовершенствования методов диагностики на основе рекомбинантных гибридных бифункциональных белков, составной частью которых являются высокоактивные морские ферменты. Представлены данные по геномам морских бактерий как источника ценных ферментов и метаболитов.

Ключевые слова: морские организмы, ферменты, гибридные белки, мутагенез, геномные исследования.

Marine biochemistry: achievements and prospects of structural and functional researches of genes and genomes of marine organisms. L.A. BALABANOVA, M.P. ISAEVA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The results of studies on the marine origin genes using genomics and genetic engineering technologies are reported. Herein, there are examples of biopolymers investigation and improvement of diagnostic methods based on the recombinant hybrid bifunctional proteins genetically labelled by the highly active marine enzymes. The data concerning the marine bacteria genomes as a source of biotechnologically valuable enzymes and metabolites are presented.

Key words: marine organisms, enzymes, fusion proteins, mutagenesis, genomic research.

Лаборатория морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН была организована в 1972 г. на базе группы изучения нуклеиновых кислот. Со дня основания и до 2018 г. ее бессменным руководителем был Валерий Александрович Рассказов. На протяжении длительного времени основным научным направлением лаборатории было исследование морских ферментов нуклеинового обмена, таких как нуклеазы, нуклеотидкиназы и фосфатазы. Однако позже, с активным развитием методов молекулярного клонирования с постановкой так называемого «полного цикла» – от установления нуклеотидной последовательности, конструирования генетической конструкции и до получения функционально-активного рекомбинантного белка, область научных интересов лаборатории расширилась. При активном сотрудничестве с другими подразделениями института новым направлением исследований стало изучение структуры уникальных и ценных для биотехнологии белков морских и наземных организмов. Результаты этих исследований освещены в обзорной статье В.А. Рассказова [5]. Недавние научные достижения лаборатории, рассмотренные через призму изучения и применения генов морских организмов на основе использования методов сайт-направленного мутагенеза, технологий геномного секвенирования, филогенетического и эволюционного анализа, представлены в данной обзорной статье.

БАЛАБАНОВА Лариса Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, *ИСАЕВА Марина Петровна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: issaeva@piboc.dvo.ru

Приоритетным направлением «Стратегии научно-технического развития Российской Федерации» является переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных). Решение этих задач наиболее полно может быть осуществлено за счет изучения и использования биологических ресурсов Океана. Морские организмы и микроорганизмы – ценный источник уникальных биополимеров, прежде всего ферментов, которые могут рассматриваться в качестве новых катализаторов для различных биотехнологических процессов и получения диагностических и терапевтических препаратов. Преимущество этих ферментов заключается в молекулярных и каталитических особенностях, обусловленных адаптационной эволюцией морских (микро)организмов под воздействием крайних значений физических факторов окружающей среды [8].

Высокая активность ферментов из морских источников позволяет эффективно использовать их в генно-инженерных конструкциях для исследования структурно-функциональных свойств новых белков. Для определения углеводсвязывающих свойств рекомбинантного бифункционального химерного лектина мидии CGL/CmAP с активностью щелочной фосфатазы (CmAP) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 в отношении муциноподобных онкомаркеров был проведен направленный мутагенез сайтов связывания лектина CGL [14]. Методом твердофазного лектин-ферментного анализа установлено, что сила связывания комплекса «лектин–лиганд» у мутантных форм значительно меньше, чем у дикого типа. Результаты анализа активности фермента CmAP у мутантов гибридного белка и анализа его механизма связывания с такими лигандами, как галактоза, глоботриоза и муцин, *in silico* показали индивидуальный вклад аминокислотных остатков CGL в углеводсвязывающую активность. Впервые установлено, что сродство CGL к лигандам зависит от химической структуры трех эпитопных остатков углеводов, что определяет количество водородных связей в комплексах «CGL–лиганд». Полученные результаты важны для понимания молекулярного механизма функционирования CGL, а также для разработки синтетического аналога CGL с улучшенными углеводсвязывающими свойствами для диагностики и терапии рака.

Для ферментов морского происхождения характерны высокая удельная активность при пониженных температурах и устойчивость к действию неблагоприятных факторов. Понимание особенностей их физико-химических и каталитических свойств возможно при сравнительном анализе структур ферментов из морских и наземных организмов [17]. Альфа-галактозидазы, инактивирующие серологическую активность эритроцитов человека группы В, – относительно редкие ферменты. С целью исследования свойств альфа-галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 был получен ее рекомбинантный аналог α -Gal и сконструированы мутанты [6, 9]. В результате установлено, что α -Gal катализирует гидролиз альфа-О-гликозидной связи с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата, что характерно для альфа-галактозидаз семейства GH36. Искусственное увеличение термостабильности молекулы психрофильного фермента путем замены ключевых аминокислотных остатков по тому же принципу, который существует в структурной организации мезофильных и термостабильных гомологов, ведет к ограничению созданных природой вариантов его активной конформации, что неизбежно отражается на общей скорости каталитической реакции и механизме действия фермента.

К недавним достижениям лаборатории относится усовершенствование метода диагностики псевдотуберкулеза путем получения генно-инженерного гибридного бифункционального белка CmAP/OmpF на основе порина OmpF из патогенной для человека бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* и высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296, у которой каталитическая эффективность субъединицы в разы превышает таковую известных димерных аналогов [3, 4, 13]. Показано, что в гибридном белке модуль OmpF не теряет свойств диагностического антигена, а модуль CmAP сохраняет ферментативную активность для обнаружения комплексов «порин–специфическое

антитело». Использование данного гибридного белка позволяет исключить применение меченных ферментами вторых антител при диагностике острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза.

Несомненный практический интерес представляют результаты действия рекомбинантных щелочных фосфатаз и альфа-галактозидаз морских бактерий на клетки патогенных бактерий и их способность к образованию биопленок [11]. Было показано, что рекомбинантные ферменты морских бактерий *C. amphilecti* КММ 296 и *Pseudoalteromonas* sp. 701 обладают антибиопленочной активностью в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. enterica* и *S. aureus*. Полученные результаты представляют интерес с точки зрения использования психрофильных морских ферментов для контроля качества пищевых продуктов и безопасности медицинского оборудования.

К уникальным белкам морского генеза относятся цитолизины актиний (актинопорины). Интерес к таким соединениям связан с возможностью создания на их основе иммуноконъюгатов для направленного уничтожения клеток чужеродных организмов или опухолевых клеток [18]. Установлено, что геном морской анемоны *Heteractis crispa* содержит множество генов цитолизинов, различающихся между собой заменами в области, кодирующей зрелый белок. Для этих генов наблюдается сильное влияние стабилизирующего отбора на большинство сайтов, связанных со стабильностью структуры и порообразующей активностью [15].

Морские мицелиальные грибы являются перспективными продуцентами полисахариддеградирующих ферментов с интересными для сельского хозяйства и медицины свойствами. В ходе исследований найдены новые штаммы с высокоактивными и специфичными ламинариназами, альгинатлиазами, каррагиназами, полиманнуронатлиазами, агаразами и фукоиданазами [2]. В некоторых наземных штаммах микромицетов уровень активности ферментов, катализирующих расщепление полисахаридов водорослей, превышал во много раз активности, проявленные морскими штаммами, что может указывать на вторичное морское происхождение почвенных грибов, выделенных в приморском регионе. Эти результаты открывают перспективы дальнейшего изучения полисахариддеградирующего потенциала мицелиальных грибов для переработки различных растительных отходов сельского хозяйства и марикультур [10].

С целью открытия новых метаболических путей, получения новых сведений о распределении и эволюции генов и оперонов, отвечающих за синтез перспективных биополимеров и природных соединений, в лаборатории были начаты работы по секвенированию геномов морских бактерий. Методом пиросеквенирования были получены последовательности геномов таких морских бактерий, как *Vitellibacter vladivostokensis* КММ 3516Т [7], *C. amphilecti* КММ 296 (ранее – *C. marina*) [1], *Zobellia amurskyensis* КММ 3676Т [12], *Vibrio* sp. СВ1-14 [16].

Анализ последовательностей геномов обнаружил присутствие большого числа генов, отнесенных к гипотетическим генам белков с неустановленной функцией, а значит новых метаболических путей и их продуктов, представляющих интерес как для фундаментальной науки, так и для биотехнологических решений.

Морские бактерии семейства Flavobacteriaceae хорошо известны как ключевые участники процессов деградации биополимеров, главным образом полисахаридов водорослей. По данным секвенирования, геном морской флавобактерии *Z. amurskyensis* КММ 3676Т кодирует 361 ген системы углеводного обмена, включая 97 генов гликозилгидролаз, 13 генов полисахаридлиаз и 77 генов сульфатаз [12]. Полученная генетическая информация указывает на то, что бактерия обладает высоким ферментативным потенциалом для гидролиза основных полисахаридов водорослей, а наличие сульфатаз способствует эффективной деградации сульфатированных форм полисахаридов, таких как фуканы, каррагинаны и хондроитин. Большое содержание генов полисахариддеградирующих экзоферментов может указывать на важную экологическую роль бактерии в круговороте органических углерода и серы в океане. В дальнейшем на основании анализа

геномных данных могут быть выбраны гены для получения рекомбинантных аналогов уникальных ферментов, пригодных для модификации и деградации коммерчески важных полисахаридов водорослей.

Новые технологии исследования геномов позволяют также осуществлять направленный поиск генных кластеров для кодирования путей биосинтеза ценных вторичных метаболитов. Особый интерес представляет изучение генома морской бактерии *Vibrio* sp. СВ1-14, выделенной из слизи ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus* и являющейся продуцентом гуанидинового алкалоида 6-эпи-монанхорина, обладающего цитостатической активностью [16]. Изучение генома *Vibrio* sp. СВ1-14 открывает возможности для идентификации не только генного кластера биосинтеза 6-эпи-монанхорина, но и других редких и уникальных биосинтетических кластеров. Предварительный анализ генома показал присутствие генных кластеров, ответственных за синтез сахаров, жирных кислот и антимикробных пептидов. Так, в этом геноме найден крайне редко встречающийся биосинтетический кластер антибиотика дапдиамида. Однако ключевых генов ферментов, предсказанных гипотетической схемой биосинтеза 6-эпи-монанхорина, обнаружено не было. Поскольку большинство кластеров определяются как гипотетические, дальнейшая работа должна быть сосредоточена на получении мутантов с «выключенными» генами, а также на привлечении методов метабомики для детекции биосинтетических интермедиатов.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность молекулярно-генетических и геномных исследований морских биополимеров в качестве новых инструментов в биохимии и биотехнологии морских (микро)организмов, позволяющих открывать новые структуры и функции, находить новые биологические источники уникальных ферментов и вторичных метаболитов, а также получать ключевые ферменты, участвующие в биосинтезе морских биологически активных веществ. Не вызывает сомнений тот факт, что использование геномных и генно-инженерных технологий будет способствовать поиску новых биохимических соединений морского генеза и созданию на их основе новых высокоэффективных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Ковальчук С.Н., Бабий А.В., Шевченко Л.С., Сон О.М., Косовский Г.Ю., Рассказов В.А. Геном морской бактерии *Cobetia marina* КММ 296, выделенной из мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Биол. моря. 2016. Т. 42, № 1. С. 78–81. – http://bm.dvo.ru/2016/n1/r_a013.htm
2. Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Слепченко Л.В., Киричук Н.Н., Худякова Ю.В., Сон О.М., Пивкин М.В., Рассказов В.А. Полисахариддеградующая активность морских и наземных штаммов микелиальных грибов // Биоорган. химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 425–432. – <http://www.rjbc.ru/2018/4/abstracts/9.shtml>
3. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Буйновская Н.С., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и порообразующего мембранного белка порина OmpF, и рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/OmpF – продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF: пат. 2634871 РФ. Заявл. 03.08.2016; опубл. 07.11.2017, Бюл. № 31.
4. Буйновская Н.С., Балабанова Л.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А. Гибридный бифункциональный белок на основе OMPF порина и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорган. химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 417–424. – <http://www.rjbc.ru/2018/4/abstracts/8.shtml>
5. Рассказов В. А. Ферменты морских организмов и перспективы их использования в медицине и биотехнологии // Вестн. ДВО РАН. 2014. № 1. С. 61–68.
6. Слепченко Л.В., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Исаков В.В., Подволоцкая А.Б., Елисейкина М.Г., Носкова Ю.А., Рассказов В.А. Свойства и возможная биологическая роль альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 // Вестн. ДВО РАН. 2017. № 2. С. 51–58.
7. Чернышева Н.Ю., Ромашко Д.А. Геномный анализ гидролитического потенциала морской бактерии *Vitellibacter vladivostokensis* // Вестн. ДВО РАН. 2015. № 6. С. 159–163. – <https://elibrary.ru/item.asp?id=25501013>
8. Arrigo K.R. Marine microorganisms and global nutrient cycles // Nature. 2004. Vol. 437, N 7057. P. 349. – <https://www.nature.com/articles/nature04159>
9. Bakunina I., Slepchenko L., Anastuyuk S., Isakov V., Likhatskaya G., Kim N., Tekutyeva L., Son O., Balabanova L. Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant α -galactosidase from cold-adapted marine

- bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 and its C494N and D451A mutants // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 10. P. 349. – <https://doi.org/10.3390/md16100349>
10. Balabanova L., Slepchenko L., Son O., Tekutyeva L. Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 1527. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01527>
 11. Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Y., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // *Food Control*. 2017. Vol. 78. P. 270–278. – <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.029>
 12. Chernysheva N.U., Likhatskaya G.N., Nedashkovskaya O.I., Isaeva M.P. Comparative genomics of *Zobellia*: analysis of polysaccharide lyases genes and operons // *Vestnik FEB RAS*. 2018. № 6. Supplement. – www.vestnikdvo.ru/index.php/vestnikdvo/.../204
 13. 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. – <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0142>
 14. Kovalchuk S.N., Buinovskaya N.S., Likhatskaya G.N., Rasskazov V.A., Son O.M., Tekutyeva L.A., Balabanova L.A. Mutagenesis Studies and Structure–function Relationships for GalNAc/Gal-Specific Lectin from the Sea Mussel *Crenomytilus grayanus* // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 12. P. 471. – <https://doi.org/10.3390/md16120471>
 15. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A., Guzev K., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 6. P. 183. – <https://doi.org/10.3390/md16060183>
 16. Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., Isaeva M., Chernysheva N., Popov R., Bystritskaya E., Dmitrenok P., Stonik V. Marine bacterium *Vibrio* sp. CB1-14 produces guanidine alkaloid 6-epi-monanchlorin, previously isolated from marine polychaete and sponges // *Mar. Drugs*. 2019. Vol. 17, N 4. P. 213. – <https://doi.org/10.3390/md17040213>
 17. Rina M., Pozidis C., Mavromatis K., Tzanodaskalaki M., Kokkinidis M., Bouriotis V. Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5 // *The FEBS J*. 2000. Vol. 267, N. 4. P. 1230–1238. – <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01127.x>
 18. Tejuca M., Anderlueh G., Dalla Serra M. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins // *Toxicon*. 2009. Vol. 54, N. 8. P. 1206–1214. – <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.025>

М.М. МОНАСТЫРНАЯ, Е.В. ЛЕЙЧЕНКО, И.Н. ГЛАДКИХ,
Е.А. ЗЕЛЕПУГА, О.В. СИНЦОВА, Р.С. КАЛИНА, А.Н. КВЕТКИНА,
Э.П. КОЗЛОВСКАЯ

Фармакологический потенциал пептидов актиний рода *Heteractis*

Представлены результаты исследования структуры и функции пептидов актиний рода Heteractis: нейротоксинов II структурного типа, APETx-подобных пептидов, пороформирующих токсинов, ингибиторов сериновых протеаз Кунитц-типа и альфа-амилаз, – показавших свой значительный фармакологический потенциал.

Ключевые слова: актинии, нейротоксины, APETx-подобные пептиды, пороформирующие токсины, ингибиторы Кунитц-типа, биологические мишени.

Pharmacological perspectives of peptides from sea anemones of the *Heteractis* genus. M.M. MONASTYRNAYA, E.V. LEYCHENKO, I.N. GLADKIKH, E.A. ZELEPUGA, O.V. SINTSOVA, R.S. KALINA, A.N. KVETKINA, E.P. KOZLOVSKAYA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The study results of structure and function of peptides from sea anemone of the Heteractis genus, including structural type II neurotoxins, APETx-like peptides, pore-forming toxins, Kunitz-type serine protease inhibitors and alpha-amylases, that showed a visible pharmacological potential, are presented.

Key words: sea anemones, neurotoxins, APETx-like peptides, pore-forming toxins, Kunitz-type, biological targets.

В последние годы усилия коллектива лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН были направлены на установление структуры физиологически активных соединений белковой природы, изучение молекулярных механизмов их взаимодействия с биологическими мишенями, оценку фармакологического потенциала с целью выявления соединений, высокоспецифичных по отношению к различным биологическим мишеням. Как известно, сбой в работе таких молекулярных мишеней, как ионные каналы и рецепторы, вызывают серьезные патологические состояния, а воздействие специфичных по отношению к тем или иным мишеням пептидных лигандов корректирует их функциональную активность и оказывает таким образом лечебный эффект. Расширение необходимого фармакологического инструментария для медицинского применения является актуальным направлением развития наук о жизни.

Одним из широко исследуемых и перспективных природных источников биологически активных веществ является ядовитый секрет морских кишечнорастных – актиний, в частности тропических видов *Heteractis crispa* и *Heteractis magnifica* (тип Cnidaria, класс

*МОНАСТЫРНАЯ Маргарита Михайловна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, ЛЕЙЧЕНКО Елена Владимировна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией, ГЛАДКИХ Ирина Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ЗЕЛЕПУГА Елена Александровна – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, СИНЦОВА Оксана Владимировна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, КАЛИНА Римма Сергеевна – младший научный сотрудник, КВЕТКИНА Александра Николаевна – младший научный сотрудник, КОЗЛОВСКАЯ Эмма Павловна – доктор химических наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: rita1950@mail.ru

Anthozoa), представляющий собой смесь множества пептидов, используемых актиниями для защиты от потенциальных хищников и нападения на жертвы. Установлено, что в ходе эволюции генома актиний гены, кодирующие пептиды, различающиеся структурными фолдами, претерпели множественную дубликацию, которая привела к образованию мультигенных семейств. Благодаря мутациям новых копий генов пептидные токсины, кодируемые представителями данных семейств (нейротоксины структурных типов I и II, APETx-подобные пептиды, пороформирующие токсины (ПФТ), ингибиторы сериновых протеаз Кунитц-типа), диверсифицировали и образовали комбинаторные библиотеки высокоомологичных пептидов, различающихся точечными заменами аминокислотных остатков (а.о.). Представители различных комбинаторных библиотек приобрели полифункциональность и уточненный механизм взаимодействия с различными биологическими мишенями жертв актиний, способность избирательно взаимодействовать с различными типами и подтипами потенциал-зависимых и протон-активируемых ионных каналов (K_v , Na_v , ASICs), ионотропных рецепторов (TRPV1, TRPA, гистаминовые H1), сфингомиелин (SM)-содержащих цитоплазматических мембран, эндогенных протеаз (сериновые, цистеиновые, аспарагиновые) и амилаз. Нарушение нормальной функциональной активности таких биологических мишеней обуславливает развитие серьезных патологий, нарушение механизмов сигнальной трансдукции, клеточного цикла, иммунного ответа и др. Пептиды вышеназванных структурных классов проявляют при взаимодействии с мишенями модулирующую (активирующую/потенцирующую или блокирующую) активность и оказывают тем самым фармакологический эффект [17]. Изучение молекулярных механизмов белок-лигандных взаимодействий пептидных компонентов ядов с биологическими мишенями позволяет использовать их, в силу уникальных свойств и огромного структурного разнообразия, в качестве инструментов исследования молекулярной организации и механизмов функционирования ионных каналов, рецепторов, ферментов и цитоплазматических мембран.

Данная обзорная статья обобщает полученные в последние годы в лаборатории химии пептидов результаты исследования структурно-функциональных взаимоотношений нескольких групп пептидных токсинов актиний *H. crispa* и *H. magnifica*, показывает возможные перспективы их применения в качестве фармакологических агентов.

***Heteractis* нейротоксины – модуляторы Na_v каналов**

Ранее у пяти высокотоксичных для млекопитающих и крабов нейротоксинов структурного типа II, RTX-I – RTX-V (48 а.о., 5 кДа), выделенных из актинии *H. crispa* [4], были определены аминокислотные последовательности и локализация дисульфидных связей: C³–C⁴³, C⁵–C³³, C²⁶–C⁴⁴ (рис. 1).

Недавно методами структурной химии белка и тандемной масс-спектрометрии были установлены структуры еще двух нейротоксинов *H. crispa*: RTX-VI, аналог RTX-III без остатка Arg13, и δ -SHTX-Hcr1f [15], аналог нейротоксина RpII (P01534) из *Heteractis pau-motensis* (данные не опубликованы). Исследование механизма действия этих нейротоксинов выявило определенную специфику связывания пептидов с различными субтипами Na_v , экспрессированными в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Однако при некоторых различиях в аффинности связывания нейротоксинов структурного типа II с сайтом 3 субтипов Na_v 1.2, 1.3, 1.6 наблюдаются значительное замедление кинетики их инактивации и пролонгация потенциала действия, что приводит к массивному выходу нейротрансмиттеров из нервных терминалей [7]. Благодаря наличию позитивного инотропного эффекта *Heteractis* нейротоксины оказывают кардиостимулирующий эффект, который может быть использован при экстремальных ситуациях. Возможно, в дальнейшем будут получены аналоги, подобные малотоксичным для млекопитающих нейротоксинам RTX-II и RTX-IV, пригодные для применения в кардиологии.



Рис. 1. Структура нейротоксинов актиний.

А – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей нейротоксинов структурного типа II: RTX-I (P30831), RTX-II (P30783), RTX-III (P30832) [4], RTX-IV (P30784), RTX-V (P30785) из *Heteractis crispa*, RpII (P01534) из *H. paumotensis*. Жирным шрифтом показаны точечные замены остатков в последовательностях, красным цветом – функционально значимый для связывания с Na_v остаток Arg13. Прямые линии показывают локализацию дисульфидных связей $\text{C}^3\text{-C}^{43}$, $\text{C}^5\text{-C}^{33}$, $\text{C}^{26}\text{-C}^{44}$;

Б – суперпозиция теоретической модели 3D структуры нейротоксина RTX-III (темно-серый) и прототипа RplISh1 (светло-серый, PDB ID: 1Sh1), представленных в виде ленточных диаграмм, стержневые фрагменты показывают расположение дисульфидных связей. Визуализация выполнена с помощью программы Chimera 1.10.1

Heteractis APETx-подобные ингибиторы ASICs каналов

Поиск и исследование лигандов протон-активируемых ASICs каналов представляют огромный интерес для фармакологии, поскольку эти ионные каналы включены в ряд патофизиологических процессов. Лиганды ASICs каналов, оказывая специфическое воздействие на их функциональную активность, в том числе механизмы генерации боли, потенцируют или частично ингибируют различные субтипы ASICs [20].

Недавно из актинии *H. crispa* выделено и охарактеризовано три новых пептида, π -AnmTX Hcr 1b-2, -3 и -4 (Hcr 1b-2, -3, -4) [14] (41 а.о., 4,5 кДа) (рис. 2), гомологичных полученным ранее пептидам π -AnmTX Hcr 1b-1 (Hcr 1b-1) [2] и APETx2 из актинии *Anthopleura elegantissima* [8], имеющих β -дефензин-подобный фолд.

Электрофизиологическое тестирование пептидов показало, что, в отличие от APETx2, обратимо ингибирующего только гомомерные ASIC3 (с $\text{IC}_{50} = 63 \text{ nM}$) и некоторые гетеромерные каналы, такие как ASIC2b+3 ($\text{IC}_{50} = 117 \text{ nM}$), ASIC1b+3 ($\text{IC}_{50} = 0,9 \text{ мкМ}$) и ASIC1a+3 ($\text{IC}_{50} = 2 \text{ мкМ}$) [8], все *Heteractis* APETx-подобные пептиды ингибируют не только

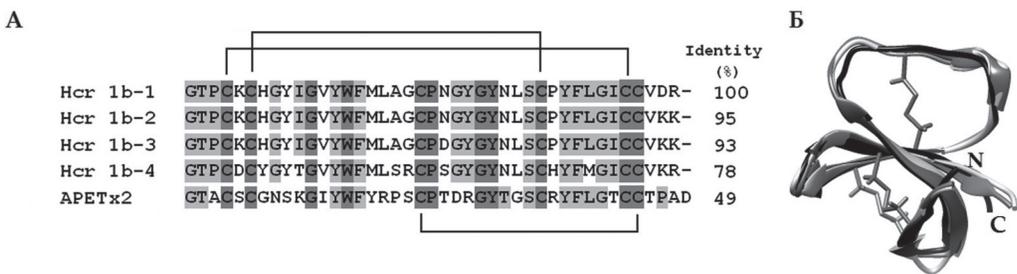


Рис. 2. Структура APETx-подобных пептидов актиний.

А – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей APETx-подобных пептидов Hcr 1b-1 (UniProt ID: P0DL87) [2], Hcr 1b-2 (C0HL52), Hcr 1b-3 (C0HL53), Hcr 1b-4 (C0HL54) [14] из *Heteractis crispa* и APETx2 (P61542) [8] из *Anthopleura elegantissima*. Идентичные и консервативные остатки изображены на темном и сером фоне соответственно. Прямые линии показывают локализацию дисульфидных связей, $\text{C}^4\text{-C}^{37}$, $\text{C}^6\text{-C}^{30}$, $\text{C}^{20}\text{-C}^{38}$. Выравнивание выполнено с помощью программы Vector NTI;

Б – суперпозиция теоретических моделей 3D структур пептидов Hcr 1b-2 (темно-серый), -4 (черный) и прототипа APETx2 (светло-серый, PDB ID: 1WXN). Модели представлены в виде ленточных диаграмм, стержневые фрагменты показывают расположение дисульфидных связей. Визуализация выполнена с помощью программы Chimera 1.10.1

гомомерные ASIC3, но и ASIC1a каналы [14]. Преобладающий пептид, Hcr 1b-2, является первым ингибитором ASIC1a. Он обратимо ингибирует как rASIC1a ($IC_{50} = 4,8$ мкМ), так и rASIC3 ($IC_{50} = 15,9$ мкМ), проявляя, подобно Hcr 1b-1 [2], анальгетический эффект на модели кислотоиндуцированной боли, и значительно снижает порог болевой чувствительности экспериментальных животных.

Heteractis актинопорины и их биологические мишени

Известно, что многие виды актиний продуцируют несколько гомологичных пороформирующих токсинов (α -ПФТ, или актинопорины, 20 кДа) [18], двойственность природы которых (фолд α/β -сэндвич, рис. 3, А) обуславливает специфичность взаимодействия их амфифильных α -спирализованных N-концевых фрагментов (28 а.о.) с биологическими мишенями – сфингомиелин-содержащими мембранами эукариотов. Образование функционально активных белок-липидных пор вызывает быстрый лизис мембран (рис. 3, Б). Нами обнаружено большое мультигенное семейство, кодирующее актинопорины (47 представителей) [16], разнообразие которых и множественные мутации а.о. в N-концевом фрагменте свидетельствуют об их диверсификации, направленной на увеличение количества различных биологических мишеней. Кроме того, обнаружено альтернативное взаимодействие трипептида RGD некоторых актинопоринов с интегринами цитоплазматических мембран [10]. Подобный механизм порообразования позволяет использовать актинопорины в качестве противоопухолевых агентов. Установлено, что цитотоксическое действие актинопорина RTX-A на опухолевые клетки (HeLa, THP-1, MDA-MB-231, SNU-C4, HL-60) обусловлено индукцией p53-независимого апоптоза и ингибированием активности онкогенных ядерных факторов AP-1 и NF- κ B [9].

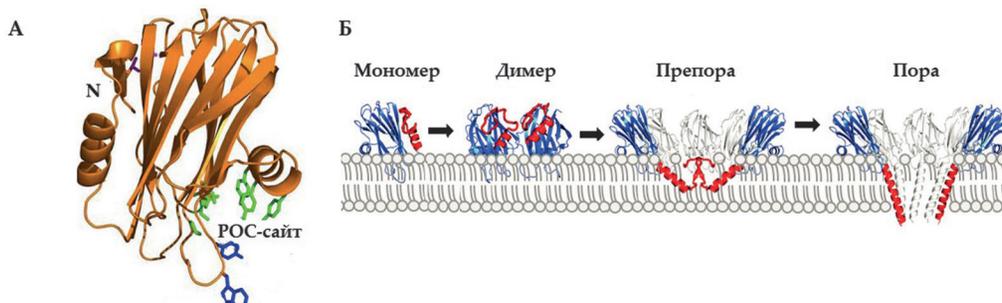


Рис. 3. Структура и механизм действия актинопоринов актиний.

А – теоретическая модель 3D структуры актинопорина;

Б – модель порообразования: мономер связывается с мембраной, обеспечивая белок-белковое взаимодействие двух молекул с образованием димера, который затем взаимодействует с мономером или димером, затем происходят включение удлинившихся в мембранном интерфейсе N-концевых фрагментов в липидный бислой и образование первоначально препоры, а затем и функциональной поры

Heteractis ингибиторы сериновых протеаз и амилаз

К настоящему времени из *H. crispa* выделено и охарактеризовано несколько ингибиторов сериновых протеаз (56 а.о., ~6 кДа), имеющих Кунитц-фолд, стабилизированный тремя дисульфидными мостиками (рис. 4) [1, 5, 11, 12]. Этот вид актиний содержит мультигенное HCGS суперсемейство пептидов Кунитц-типа (более 70 представителей), образующих комбинаторную библиотеку, аминокислотные последовательности которых, выведенные на основе кДНК сиквенсов [13], имеют ряд точечных замен. Согласно филогенетическому и структурно-функциональному анализу, диверсификация ингибиторов Кунитц-типа обусловила их суб- и неофункционализацию, что привело к появлению

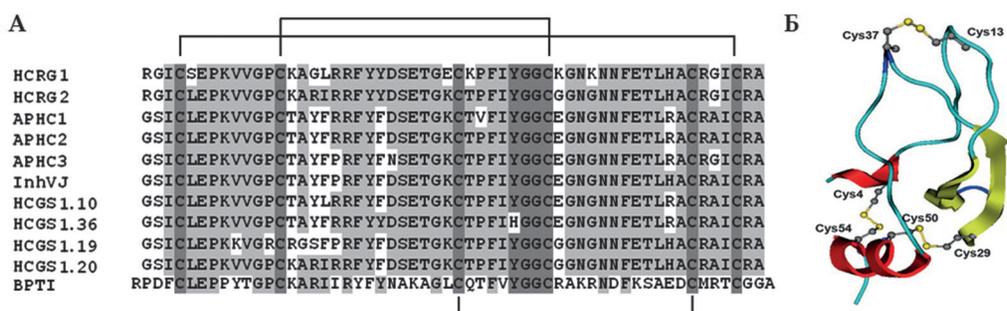


Рис. 4. Структура пептидов Кунитц-типа.

А – множественное выравнивание аминокислотных последовательностей пептидов Кунитц-типа: HCRG1 (CONJU6) и HCRG2 (CONJU7) [12], APHC1 (B2G331), APHC2 (CONJF4) и APHC3 (CONJF3) [1, 5, 6], InhVJ (P0DMJ5) [11], rHCGS 1.10, rHCGS 1.36, rHCGS 1.19, rHCGS 1.20 [13] из *Heteractis crispa*; BPTI (P00974) из *Bos taurus*. Идентичные и консервативные остатки изображены на темном и сером фоне соответственно. Прямые линии показывают локализацию дисульфидных связей C⁴-C⁵⁴, C¹³-C³⁷, C²⁹-C⁵⁰. Выравнивание выполнено с помощью программы Vector NTI;

Б – теоретическая модель 3D структуры пептида HCRG1, представленная в виде ленточной диаграммы, шаростержневые фрагменты показывают расположение дисульфидных связей. Визуализация выполнена с помощью программы Discovery Studio 4.1

полифункциональности у некоторых представителей семейства [13]. Так, нативные пептиды комбинаторной библиотеки APHC1, APHC2, APHC3 [1, 5] и рекомбинантный пептид HCRG21 [19], будучи слабыми ингибиторами сериновых протеаз (*K_i* в диапазоне концентраций 10⁻⁶–10⁻⁷ М), взаимодействуют с рецептором TRPV1 и проявляют анальгетическое и противовоспалительное действие *in vivo* (показано для APHC1-3 [1, 5, 6]). APHC1 был первым пептидным модулятором TRPV1, ингибирующим 32 % капсаицин-индуцируемых токов (EC₅₀ = 54 нМ) [5], тогда как HCRG21 оказался первым пептидным блокатором этого рецептора (IC₅₀ = 6,9 мкМ) [19].

Кроме того, было установлено, что некоторые рекомбинантные пептиды (HCGS 1.10, 1.19, 1.20 и 1.36) обладают анальгетическим действием *in vivo* [23] и антигистаминной активностью *in vitro* (HCGS 1.19, 1.20 и 1.36) [21], что, вероятно, указывает на их возможное противовоспалительное действие. Показано, что нативные пептиды HCRG1 и HCRG2 снижают уровень секреции медиаторов воспаления в макрофагах, активированных липополисахаридом [12], и, вероятно, также могут проявлять противовоспалительный эффект.

Недавно из актинии *H. magnifica* выделен нетоксичный пептид с β-дефензин-подобным фолдом, магнификамид (4,7 кДа, 44 а.о.) [22], ингибирующий панкреатическую α-амилазу, участвующую в развитии диабета второго типа. Получен активный рекомбинантный аналог ингибитора, и в дальнейшем будет проведена оценка его фармакологического потенциала.

Заключение

Представленные данные согласуются с утвердившимся мнением о том, что пептиды актиний являются перспективными лидерными молекулами для создания относительно безопасных, эффективных фармакологических препаратов направленного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов С.А., Андреев Я.А., Мурашев А.Н., Скобцов Д.И., Дьяченко И.А., Гришин Е.В. Новые полипептидные компоненты с анальгетической активностью из морской анемоны *Heteractis crispa* // Биоорг. химия. 2009. Т. 35, № 6. С. 789–798.

2. Козлов С.А., Осмаков Д.И., Андреев А.Я., Кошелев С.Г., Гладких И.Н., Монастырская М.М., Козловская Э.П., Гришин Е.В. Полипептидный токсин из морской анемоны, ингибирующий протончувствительный канал ASIC3 // Биоорган. химия. 2012. Т. 38, № 6. С. 653–659.
3. Синцова О.В., Монастырская М.М., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Лейченко Е.В., Аминин Д.Л., Козловская Э.П. Противовоспалительная активность полипептида актинии *Heteractis crispa* // Биоорган. химия. 2015. Т. 41, № 6. С. 657–663.
4. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П., Еляков Г.В. Аминокислотная последовательность нейротоксина III из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11, № 3. С. 302–310.
5. 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. Vol. 283. P. 23914–23921.
6. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Korolkova Y.V., Dyachenko I.A., Bondarenko D.A., Skobtsov D.I., Murashev A.N., Kotova P.D., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kolesnikov S.S., Grishin E.V. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia // Mar. Drugs. 2013. Vol. 11. P. 5100–5115.
7. Catterall W.A., Beress L. Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore // J. Biol. Chem. 1978. Vol. 253. P. 7393–7396.
8. Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // EMBO J. 2004. Vol. 23. P. 1516–1525.
9. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.O., Kwak J.Y., Bode A.M., Dong Z. et al. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) // Toxicon. 2010. Vol. 55. P. 811–817.
10. García-Linares S., Richmond R., García-Mayoral M.F., Bustamante N., Bruix M., Gavilanes J.G., Martínez-Del-Pozo A. The sea anemone actinoporin (Arg-Gly-Asp) conserved motif is involved in maintaining the competent oligomerization state of these pore-forming toxins // FEBS J. 2014. Vol. 281. P. 1465–1478.
11. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Leychenko E. et al. Atypical reactive center Kunitz-type inhibitor from the sea anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2012. Vol. 10. P. 1545–1565.
12. Gladkikh I., Monastyrnaya M., Zelepuga E., Sintsova O., Tabakmakher V., Gnedenko O., Ivanov A., Hua K.-F., Kozlovskaya E. New Kunitz-Type HCRG Polypeptides from the Sea Anemone *Heteractis crispa* // Mar. Drugs. 2015. Vol. 13. P. 6038–6063.
13. Isaeva M.P., Chausova V.E., Zelepuga E.A., Guzev K.V., Tabakmakher V.M., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // Peptides. 2012. Vol. 34. P. 88–97.
14. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels // Peptides. 2018. Vol. 104. P. 41–49.
15. Kalina R., Gladkikh I., Peigneur S., Dmitrenok P., Zelepuga E., Monastyrnaya M. Type II toxins from sea anemone *Heteractis crispa* with various effects on activation and inactivation of voltage-gated sodium channels // Toxicon. 2019. Vol. 159. P. S18.
16. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Malyrenko O., Kvetkina A., Pavlenko A., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa*: diversity and pharmacological potential // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16. E183 [1–18]. DOI: 10.3390/md16060183.
17. Madio B., King G.F., Undheim E.A.B. Sea Anemone Toxins: A Structural Overview // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17. E325 [1–26]. DOI: 10.3390/md17060325.
18. Monastyrnaya M., Leychenko E., Isaeva M., Likhatskaya G., Zelepuga E., Kostina E., Trifonov E., Nurminski E., Kozlovskaya E. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships // Toxicon. 2010. Vol. 56. P. 1299–1314.
19. Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., Sintsova O., Gladkikh I., Leychenko E., Isaeva M., Tytgat J., Kozlovskaya E. Kunitz-type peptide HCRG21 from the sea anemone *Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // Mar. Drugs. 2016. Vol. 14. E229 [1–20]. DOI: 10.3390/md14120229.
20. Rash L.D. Acid-Sensing Ion Channel Pharmacology, Past, Present, and Future... // Adv. Pharmacol. 2017. Vol. 79. P. 35–66.
21. Sintsova O.V., Pisyagin E.A., Gladkikh I.N., Monastyrnaya M.M., Menchinskaya E.S., Leychenko E.V., Aminin D.L., Kozlovskaya E.P. Kunitz-type peptides of the sea anemone *Heteractis crispa* – potential anti-inflammatory compounds // Russ. J. Bioorg. Chem+. 2017. Vol. 43. P. 91–97.
22. Sintsova O., Gladkikh I., Chausova V., Monastyrnaya M., Anastyuk S., Chernikov O., Yurchenko E., Aminin D., Isaeva M., Leychenko E., Kozlovskaya E. Peptide fingerprinting of the sea anemone *Heteractis magnifica* mucus revealed neurotoxins, Kunitz-type proteinase inhibitors and a new β -defensin α -amylase inhibitor // J. Proteomics. 2018. Vol. 173. P. 12–21.
23. Tabakmakher V.M., Sintsova O.V., Krivoschapko O.N., Zelepuga E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P. Analgesic effect of novel Kunitz-type polypeptides of the sea anemone *Heteractis crispa* // Dokl. Biochem. Biophys. 2015. Vol. 461. P. 80–83.

Р.С. КАЛИНА, Е.В. ЛЕЙЧЕНКО,
М.М. МОНАСТЫРНАЯ, Э.П. КОЗЛОВСКАЯ

Нейротоксины актиний как инструмент воздействия на работу нервной системы

Нейро- и кардиотоксины актиний, активаторы потенциал-зависимых натриевых каналов (Na_v), являются основными компонентами яда актиний и максимально эффективными природными токсинами. Они рассматриваются в качестве перспективных молекулярных инструментов исследования механизма функционирования Na_v каналов, которые, в свою очередь, являются мишенью анестетиков, антидепрессантов, противосудорожных и антиаритмических препаратов. В лаборатории химии пептидов ТИБОУ ДВО РАН структуры и биологическая активность нейротоксинов актиний структурного типа II впервые были описаны около 35 лет назад. В настоящее время, в связи с большим интересом к механизмам регулирования активности ионных каналов с помощью природных токсинов-модуляторов, мы возобновили исследования взаимодействия нейротоксинов RpII и RTX-III с Na_v каналами млекопитающих и насекомых.

Ключевые слова: актинии, пептиды, нейротоксины, модуляторы ионных каналов, потенциал-зависимые натриевые каналы (Na_v).

Neurotoxins from sea anemones as an instrument for intervention into the nervous system activity.
R.S. KALINA, E.V. LEYCHENKO, M.M. MONASTYRNAYA, E.P. KOZLOVSKAYA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

Neuro- and cardiotoxins from sea anemones, activators of voltage-gated sodium channels (Na_v), are the major components of sea anemone venom and the most efficient natural toxins. They are considered as promising molecular tools for studying the mechanism of Na_v channels action. These channels are target for anesthetics, antidepressants, anticonvulsants and antiarrhythmic drugs. Structure and biological activity of structural type II neurotoxins from sea anemone were first described at the Laboratory of Peptide Chemistry, PIBOC FEB RAS, about 35 years ago. Currently, in relation to the great interest in regulation the activity of ion channels using natural toxin modulators, we have resumed studies of neurotoxins RpII and RTX-III interaction with mammalian and insect Na_v channels.

Key words: sea anemones, peptides, neurotoxins, modulators of ion channels, voltage-dependent sodium channels (Na_v).

Природные нейротоксины известны человечеству на протяжении многих тысячелетий. Наконечники стрел, обработанные ядами растений и животных, стали первым освоенным человеком химическим оружием. Сам термин токсинология берет начало в греческом языке, где слова «toxicos» и «toxicon» были связаны со стрельбой из лука. Лишь много позже нейротоксины получили более широкое применение в мирных сферах, таких как медицина и сельское хозяйство [3, 9]. На сегодняшний день необходимым условием

*КАЛИНА Римма Сергеевна – младший научный сотрудник, ЛЕЙЧЕНКО Елена Владимировна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией, МОНАСТЫРНАЯ Маргарита Михайловна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, КОЗЛОВСКАЯ Эмма Павловна – доктор химических наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова, Владивосток).

*E-mail: kalinarimma@gmail.com

использования любого химического соединения является выяснение его механизма действия, на что и направлены усилия огромного количества исследователей-токсикологов. Кроме того, актуальными задачами исследований являются изучение природного разнообразия токсинов, в том числе нейротоксинов, и оптимизация структур их уже известных молекул.

Нейротоксины контролируют электрическую активность нейронов, взаимодействуя с ионными каналами, представляющими собой семейство разнообразных трансмембранных белков, предназначенных для обмена ионами и небольшими молекулами с окружающей средой [14]. Исследованиями, тесно связавшими токсикологию с изучением ионных каналов, стали эксперименты Т. Narahashi и др., сообщивших в 1964 г. о блокировании токсином пуфферовых рыб – тетродотоксином (ТТХ) – потенциалзависимых натриевых каналов (Na_v) [14]. Поскольку именно их активация необходима для развития потенциала действия, некоторые специалисты называют Na_v «суррогатом жизненного духа», того, что обеспечивает поддержание жизни в высших организмах [9]. В 1963 г. А. Hodgkin и А. Huxley получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за разработку теории, описывающей потенциалы действия и роль натриевых каналов в их формировании [13]. Девять подтипов Na_v избирательно экспрессируются в тканях центральной нервной системы (ЦНС) ($Na_v1.1-1.3$, $Na_v1.6$), периферической нервной системы (ПНС) ($Na_v1.7-1.9$), кардиомиоцитах ($Na_v1.5$) и мышечных клетках ($Na_v1.4$) [9, 13].

Патологии, связанные с изменением активности Na_v каналов – аритмия и сердечная недостаточность, паралич, атаксия и миотония, эпилепсия, болевой синдром и рак [3, 9] – могут быть скорректированы специфическими модуляторами Na_v . В современной фармакологии широко применяются низкомолекулярные внутриклеточные блокаторы поры Na_v каналов – обезболивающие, антидепрессанты, антиконвульсанты или антиаритмические препараты [3, 9, 13]. Основным требованием к потенциальным лекарственным средствам является их селективность. Побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем или ЦНС недопустимы для анальгетиков, ингибирующих активность нейронов ПНС. В связи с этим ведется активный поиск селективных ингибиторов $Na_v1.7-1.9$, потенциальных мощных анальгетиков, лишенных побочных эффектов опиатов [9]. Видоспецифичные нейротоксины, малотоксичные для млекопитающих, могут быть использованы в качестве пестицидов [14].

Неудивительно, что Na_v каналы, этот важнейший элемент сигнальной системы любого многоклеточного организма, стали главной мишенью нейротоксинов, которые животные и растения используют для защиты или нападения [9]. Функциональная субъединица Na_v – сложноорганизованный белок, имеющий по крайней мере девять различных сайтов связывания токсинов, блокаторов поры или аллостерических модуляторов активации/инактивации канала [9, 13, 14]. Естественный отбор закрепил активаторы и ингибиторы Na_v в качестве обязательных компонентов ядов пауков, пчел, скорпионов, змей, моллюсков конусов и актиний [9]. На ранних этапах изучения аффинные и селективные токсины, связывающиеся с каналами, сыграли особенно заметную роль в структурно-функциональных исследованиях Na_v .

Профессор W. Catterall, стоявший у истоков исследования структуры и функции Na_v , отмечает, что был всецело захвачен возможностями использования специфичных нейротоксинов в качестве инструментов исследования для идентификации, очистки белков натриевых каналов и определения их биофизических свойств [3]. В то время, когда ничего еще не было известно о строении Na_v , он использовал α -токсин скорпиона и паралитический токсин моллюсков, сакситоксин (STX), с помощью которых установил, что Na_v канал включает пороформирующую α -субъединицу и две вспомогательные β -субъединицы, лишь одна из которых образует ковалентные связи с α -субъединицей [3].

Определение структуры, механизма функционирования и физиологической роли ионных каналов всегда было исключительно сложной задачей. С того момента, как в 1952 г.

А. Hodgkin, В. Katz и А. Huxley впервые опубликовали записи натриевых токов через мембрану нервной клетки, прошло еще 30 лет, прежде чем аминокислотная последовательность Na_v канала электрического угря *Electrophorus electricus* была определена [3, 9]. Начиная с 2012 г. появилась возможность устанавливать также и пространственные структуры бактериальных и эукариотических Na_v , даже каналов человека ($Na_v1.4\beta1$) в комплексах с токсинами-блокаторами поры и аллостерическими модуляторами яда тарантулов ($Na_v1.7\beta1\text{-}\beta2$ с ТТХ/ProTx-II и STX/HWTx-IV) [12].

Таким образом, развитие представлений о механизме функционирования Na_v каналов на протяжении десятилетий было тесно связано с применением нейротоксинов-модуляторов. Такие блокаторы, как ТТХ и STX, применяются при изучении транспорта ионов через канал, а также строения селективного фильтра. Сайт их связывания с каналом считается наиболее изученным. Чувствительность различных подтипов Na_v к ТТХ до сих пор используется для классификации каналов [13]. Модуляторы воротного механизма каналов, α - и β -токсины скорпионов, позволили подтвердить различия активированного и инактивированного состояний потенциал-чувствительных доменов Na_v [3].

Нейро- и кардиотоксины стали первой описанной структурной группой токсинов актиний. Во многом этому способствовал тот факт, что активаторы Na_v каналов составляют основную часть яда актинии [4]. На сегодняшний день определены первичные структуры более 50 нейротоксинов актиний, объединенных в четыре структурных типа исходя из гомологии их аминокислотных последовательностей. Первой установленной аминокислотной последовательностью пептида актинии стала последовательность нейротоксина типа I, АТХ-II из *Anemonia sulcata*, опубликованная в 1976 г. G. Wunderer и соавторами [4]. Параллельно велась работа по изучению антоплеуринов А и В (ApA и ApB) из *Anthopleura xanthogrammica* [4]. По сей день эти три пептида остаются наиболее изученными с точки зрения пространственной структуры и важности конкретных аминокислотных остатков (а.о.) в сохранении их биологической активности [10], главным образом кардиотоксичности [5]. В 1976 г., когда впервые было описано парализующее действие токсинов актиний и их способность продлевать потенциал действия, идея о том, что существуют различные изоформы каналов Na_v , еще не была признана. Однако уже тогда было очевидно, что исследуемые токсины актиний специфичны к тканям сердца. Самым селективным в отношении основного подтипа натриевых каналов кардиомиоцитов, $Na_v1.5$, считается пептид ApA [5].

О первом токсине – представителе второго структурного типа (RpII из *Heteractis magnifica*) сообщили Н. Schweitz и соавторы в 1985 г. [11]. Информация о первичной структуре RpII была уточнена год спустя и дополнена данными ЯМР-спектроскопии [15]. В 90-е годы уже было известно, что пептиды структурных типов I и II очень похожи (включают от 46 до 54 а.о и три дисульфидные связи), а их пространственная структура представляет собой компактный β -лист в сочетании с гибкими петлями [4, 6, 15], обеспечивающими высокую аффинность связывания с каналом и медленную кинетику ассоциации/диссоциации токсина [5].

В период с 1985 по 1991 г. сотрудниками лаборатории химии пептидов (ЛХП) ТИБОХ ДВО РАН выделено пять высокогомологичных пептидов II структурного типа, RTX-I – RTX-V, из тропической актинии *Heteractis crispa* [2]. Методом ЯМР-спектроскопии была изучена пространственная структура RTX-III [6], а также показана ведущая роль нескольких основных остатков в сохранении его биологической активности (высокой токсичности для млекопитающих) в сочетании с незначительным вкладом карбоксильных групп [8]. Тогда же было установлено, что молекула RTX-III, связываясь с внеклеточным участком канала, замедляет кинетику инактивации Na_v и делает ее неполной в результате аллостерической модификации воротного механизма канала. Взаимодействие с токсином вызывает обширные конформационные изменения канала, выходящие далеко за пределы сайта связывания пептида (сайт 3) и затрагивающие как внеклеточные, так и внутриклеточные участки Na_v . Совместная аппликация RTX-III и ТТХ продемонстрировала, что

после модификации Na_v канала токсином актинии требуется в два раза больше молекул ТТХ для его инактивации [1].

На сегодняшний день второй структурный тип включает всего восемь токсинов [4]. Пространственная структура одного из них, Sh1 из *Stichodactyla helianthus*, была установлена с помощью ЯМР-спектроскопии [4]. Структурно-функциональные взаимосвязи этих пептидов практически не исследованы, и остаются вопросы, связанные с архитектурой комплексов и молекулярными основами избирательного взаимодействия токсинов с определенными подтипами Na_v .

В 1980–1990-х годах в электрофизиологических экспериментах использовали линии клеток нейробластомы, изолированные нейроны крыс и т.п., экспрессирующие сразу несколько подтипов Na_v . С развитием технологии экспрессии различных белков в ооцитах появилась возможность определить фармакологические профили нейротоксинов в отношении ряда натриевых каналов млекопитающих и насекомых. В связи с этим в последние пять лет в ЛХП ТИБОХ ДВО РАН возобновились исследования модулирующего эффекта токсинов RTX-III и RpII на токи натриевых каналов. Полученные результаты электрофизиологических экспериментов демонстрируют, что эти пептиды, как и большинство нейротоксинов актиний, не являются специфичными и способны активировать Na_v как млекопитающих, так и насекомых. Высокая токсичность RTX-III и RpII также получила объяснение: они вызывают деполяризацию мембран нейронов ЦНС, прерывая передачу электрических импульсов, не затрагивая активность натриевых каналов мышц, сердца или $Na_v1.8$ в ПНС. Тот факт, что RTX-III и RpII увеличивают амплитуду натриевых токов минимум в два раза и полностью ингибируют инактивацию Na_v насекомых, делает их перспективными инсектотоксинами [7].

Согласно существующей модели связывание нейротоксинов с сайтом 3 стабилизирует релаксированное состояние домена IV, управляющего инактивацией канала, и препятствует его транслокации, необходимой для закрытия поры [13, 14]. При этом происходят конформационные изменения трех оставшихся доменов, приводящие к открытию поры, и токсин фиксирует канал в проводящем состоянии. Деполяризация мембраны способствует диссоциации токсинов актиний, что свидетельствует о высокой прочности комплекса токсина с каналом, находящимся в закрытом состоянии, и низкой – с инактивированным каналом [5]. Аналогичным образом действуют α -токсины скорпионов и некоторые токсины пауков, которые также связываются с сайтом 3 натриевых каналов [13, 14].

В качестве инструментов фундаментальных исследований токсины актиний могут быть использованы для определения механизма действия лигандов и процесса инактивации Na_v . Совместное применение лидокаина, внутриклеточного блокатора поры, и ArA ведет к аддитивному ингибированию воротных токов, ассоциированных с движением каждого из доменов канала. Это позволило установить, что стабилизация инактивированного Na_v канала лидокаином в большей степени достигается за счет управления доменом III, нежели доменом IV, с которым связывается ArA [5]. Кроме того, ArB был использован, в сочетании с токсинами пауков ProTx-II и HWTx-IV, для установления роли отдельных потенциал-чувствительных доменов в открытии поры и инициации процесса быстрой инактивации при транслокации домена IV [16]. Таким образом, токсины актиний являются важным и перспективным инструментом исследования воротных токов, позволяя более детально описать роль домена IV в работе канала [13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Сорокина З.А., Чижмаков И.В., Козловская Э.П., Вожжова Е.В., Еляков Г.Б. Положительная кооперативность связывания тетродотоксина натриевыми каналами нейронов спинальных ганглиев крыс, индуцируемая анемотоксином RTX-III // Докл. АН. 1985. Т. 282, № 2. С. 433–436.
2. Зыкова Т.А., Козловская Э.П. Аминокислотная последовательность нейротоксина I из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорган. химия. 1989. Т. 15, № 10. С. 1301–1306.

3. Catterall W.A. Forty years of sodium channels: structure, function, pharmacology, and epilepsy // *Neurochem. Res.* 2017. Vol. 42, N 9. P. 2495–2504.
4. Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview // *Mar. Drugs.* 2012. Vol. 10, N 8. P. 1812–1851.
5. Hanck D.A., Sheets M.F. Site-3 toxins and cardiac sodium channels // *Toxicon.* 2007. Vol. 49, N 2. P. 181–193.
6. Hinds M.G., Norton R.S. Sequential ¹H-NMR assignments of neurotoxin III from the sea anemone *Heteractis macrodactylus* and structural comparison with related toxins // *J. Protein Chem.* 1993. Vol. 12, N 3. P. 371–378.
7. Kalina R., Gladkikh I., Peigneur S., Dmitrenok P., Zelepuga E., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Type II toxins from sea anemone *Heteractis crispata* with various effects on activation and inactivation of voltage-gated sodium channels // *Toxicon.* 2019. Vol. 159, suppl. 1. P. S18.
8. Mahnir V.M., Kozlovskaya E.P. Structure-toxicity relationships of neurotoxin RTX-III from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*: modification of amino groups // *Toxicon.* 1991. Vol. 29, N 7. P. 819–826.
9. Moczydlowski E.G. On the natural and unnatural history of the voltage-gated Na(+) channel // *Curr. Top. Membr.* 2016. Vol. 78. P. 3–36.
10. Moran Y., Cohen L., Kahn R., Karbat I., Gordon D., Gurevitz M. Expression and mutagenesis of the sea anemone toxin Av2 reveals key amino acid residues important for activity on voltage-gated sodium channels // *Biochemistry.* 2006. Vol. 45, N 29. P. 8864–8873.
11. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H.P., Mahasneh D.M., Lazdunski M., Vilbois F., Tsugita A. Purification, sequence, and pharmacological properties of sea anemone toxins from *Radianthus paumotensis*. A new class of sea anemone toxins acting on the sodium channel // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24, N 14. P. 3554–3561.
12. Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. Structures of human Na_v1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins // *Science.* 2019. Vol. 363, N 6433. P. 1303–1308.
13. Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels // *Front. Pharmacol.* 2011. Vol. 2. P. 71. DOI: 10.3389/fphar.2011.00071
14. Suppiramaniam V., Bloemer J., Reed M., Bhattacharya S. Ion Channels // *Comprehensive Toxicology.* 3rd ed. Elsevier Inc., 2018. Vol. 6. P. 202–241.
15. Wemmer D.E., Kumar N.V., Metrone R.M., Lazdunski M., Drobny G., Kallenbach N.R. NMR analysis and sequence of toxin II from the sea anemone *Radianthus paumotensis* // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25, N 22. P. 6842–6849.
16. Xiao Y., Blumenthal K., Cummins T.R. Gating-pore currents demonstrate selective and specific modulation of individual sodium channel voltage-sensors by biological toxins // *Mol. Pharmacol.* 2014. Vol. 86, N 2. P. 159–167.

В.В. МИХАЙЛОВ

Исследования Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН в области морской микробиологии

В 2015–2019 гг. в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН было продолжено изучение биоразнообразия, экологических свойств и биотехнологического потенциала морских микроорганизмов. Описаны новые таксоны морских бактерий и грибов. Получены новые сведения о противомикробной активности бактерий. Изучена микобиота морских водорослей и трав. В результате исследований появились новые фундаментальные знания о жизнедеятельности морских микроорганизмов.

Ключевые слова: морская микробиология, бактерии, микроскопические грибы, таксономия, экология, биотехнология.

Researches of PIBOC FEB RAS in the area of marine microbiology. V.V. MIKHAILOV (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The studies on biodiversity, environmental properties and biotechnological potential of marine microorganisms were continued during 2015–2019. New taxa of marine bacteria and fungi were described. New information has been obtained on the antimicrobial activity of bacteria and mycobiota of algae and marine herbs investigated. New fundamental knowledge was obtained about the vital activity of marine microorganisms.

Key words: marine microbiology, bacteria, microscopic fungi, taxonomy, ecology, biotechnology.

Многие страны поддерживают исследования в области морской микробиологии и биотехнологий. В России же, являющейся морской державой, такие исследования почти не ведутся. Это относится и к такой быстро развивающейся отрасли науки, как микробный синтез ценных для человека веществ. Между тем необходимость продвижения данного научного направления очевидна. Без микробиологических исследований невозможно будет отказаться от химизации морского «сельского хозяйства» (марикультуры) и перевести его на биотехнологии, что выгодно как с экономической, так и с экологической точек зрения. Не менее важной задачей современной микробиологии является изучение микроорганизмов с целью решения проблемы охраны окружающей среды от бытового, сельскохозяйственного и техногенного загрязнения. Биотехнологии, основанные на достижениях микробиологии, могут дать большой экономический эффект и при создании безотходных производств, не нарушающих экологического равновесия. Важнейшим направлением есть и будет, конечно же, поиск, изучение и культивирование морских бактерий и грибов, синтезирующих различные биологически активные вещества. Метаболиты морских микроорганизмов могут быть использованы не только в биомедицине, но и как эмульгаторы, адгезины, поверхностно-активные вещества, для производства биодеградируемого пластика и многого другого.

МИХАЙЛОВ Валерий Викторович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ведущий лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). E-mail: mikhailov@piboc.dvo.ru

Исследования в области морской микробиологии ведутся в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) около 30 лет. Эти исследования объединены единой тематикой – изучением фундаментальных биологических свойств и вытекающего из них экологического и биотехнологического потенциала морских микроорганизмов. Основной базой для академических и прикладных работ послужила созданная в 1985 г. коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН – единственная в России, которая целиком специализируется на морских гетеротрофных бактериях, а также грибах-микросцистах из домена *Eukarya*. Коллекция входит во Всемирную федерацию коллекций культур – WFCC (номер 644, официальный акроним – КММ) и получила международное признание.

Океан, как известно, самый большой резервуар биоты, но биоразнообразие бактерий и грибов, обитающих в нем, изучено лишь в малой степени. Сотрудниками лаборатории микробиологии валидно описано более 250 новых видов, свыше 50 родов, 5 новых семейств морских бактерий и 5 новых видов грибов. Это выдающийся результат.

Морские микроорганизмы существенно отличаются от наземных и синтезируют различные биологически активные вещества, которые не обнаружены в почвенных микроорганизмах, несмотря на более чем полувековую историю таких поисков. Сведения о микроорганизмах в фундаментальной связке биоразнообразие ↔ экология ↔ биотехнология позволили выявить ряд перспективных микробных продуцентов первичных и вторичных биоактивных метаболитов. Основной целью исследований биологического разнообразия морских микроорганизмов является изучение фено-, гено- и филотипических свойств и признаков морских бактерий и грибов с последующим таксономическим описанием.

В 2015–2019 гг. были продолжены исследования в области систематики морских бактерий и грибов. Лабораторией внесен большой вклад в изучение бактерий. С помощью молекулярно-биологических методов валидно были описаны новые виды бактерий: филум (тип) *Proteobacteria* – *Sphingorhabdus pacifica*, *Rheinheimera japonica*, *Pseudomonas glareae*, *Amylibacter ulvae*, *Thalassospira australica*, *Labrenzia polysiphoniae*; филум *Bacteroidetes* – *Flavobacterium maris*, *Winogradskyella litoriviva*, *Lutibacter holmesii*, *Lacinutrix cladophorae*, *Olleya algicola*, *Polaribacter staleyii*, *Aquimarina algiphila*, *Winogradskyella profunda*, *Winogradskyella algae* [3, 5, 6–13, 15–19]. Сотрудники лаборатории микробиологии О.И. Недашковская, Л.А. Романенко и В.В. Михайлов были приглашены для подготовки нового Определителя архей и бактерий Берги (*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / ed. B.W. Whitman. Нью-Джерси: John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2015). Были написаны следующие главы: *Algibacter*, *Aquimarina*, *Arenibacter*, *Gramella*, *Leeuwenhoekiiella*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter*, *Zobellia*, *Cyclobacteriaceae* fam. nov., *Algoriphagus*, *Echinicola*, *Pontibacter*, *Flammeovirgaceae* fam. nov., *Reichenbachiella*, *Roseivirga*, *Salinibacterium*, *Winogradskyella*, *Arenicella*.

Три новых вида грибов – *Penicillium piltunense* Kirichuk et Pivkin, sp. nov., *Penicillium ochotense* Kirichuk et Pivkin, sp. nov. и *Penicillium attenuatum* Kirichuk et Pivkin, sp. nov. – были выделены из образцов грунта шельфа о-ва Сахалин возле бухты Пильгун (Охотское море). У грибов были секвенированы ITS18 последовательности, гены β -тубулина и кальмодулина. Описание новых видов микроскопических грибов пополняет знания о биоразнообразии микобиоты дальневосточных морей России. Грибы – очень важные для функционирования биосферы организмы-эукариоты [4].

Многие работы были посвящены изучению экологических свойств и биотехнологическому потенциалу морских микроорганизмов. Например, из полипов и красных водорослей, обитающих в Японском море, а также из образцов грунта и воды этого моря было выделено несколько сотен штаммов бактерий. Методами молекулярной биологии изучены их таксономическое положение и антимикробная активность в отношении микроорганизмов III и IV групп патогенности – *Escherichia coli* K-12 CL588, *Enterococcus faecium* CIP 104105, *Staphylococcus aureus* CIP 65.8^T, *Staphylococcus epidermidis* CIP 81.55^T, *Bacillus subtilis* CIP 52.65^T, *Xanthomonas* sp. pv. *badrii* LMG 546, *Candida albicans* КММ 455. Было

показано, что около 70 % морских бактерий из полипов и красных водорослей обладают антибактериальной активностью, в то время как в образцах грунта и воды бактерий с такими свойствами было значительно меньше [14].

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

Морская трава *Zostera marina* L. (взморник) произрастает на защищенных участках акваторий, где она образует обширные заросли, стабилизирующие акваземы. Мицелиальные грибы, ассоциированные с морскими травами, до сегодняшнего дня остаются малоизученной группой микроорганизмов. В результате исследований микобиоты морской травы *Z. marina* и акваземов в местах ее обитания выделено и идентифицировано 28 видов мицелиальных грибов, относящихся к девяти родам. Среди них подавляющее большинство отнесено к факультативным морским грибам и только *Paradendryphiella arenariae* и *Monodictys pelagica* являлись облигатными видами. Наиболее разнообразно по сравнению с другими родами был представлен род *Penicillium* (13 видов), вторым по числу видов был род *Trichoderma* (6 видов). Отмечено по два вида родов *Cladosporium* и *Aspergillus*, а также по одному виду родов *Paradendryphiella*, *Monodictys*, *Beauveria*, *Arthrinium* и *Acremonium*. Представители рода *Penicillium* доминировали по численности, самыми массовыми среди них были *P. thomii*, *P. glabrum* и *P. simplicissimum*. Разнообразие микромицетов в акваземах, отобранных в местах произрастания *Z. marina*, также в основном определяли виды рода *Penicillium*. Из 12 видов, принадлежавших к четырем родам, 7 видов относились к роду *Penicillium*, 3 – к роду *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. harzianum*). Грибы зеленых водорослей не изучены. Исследование микобиоты зеленых водорослей (*Ulva flexuosa*, *U. lactuca*, *U. linza*), показало, что видовой состав их грибного населения радикально отличается от грибов бурых водорослей и морских трав. Доминируют на поверхности водорослей грибы родов *Alternaria* и *Pestalotiopsis* (*A. litorea*, *A. tenuissima*, *A. alternata* и *Pestalotiopsis* spp.) [1, 2].

Сотрудники лаборатории химии микробных метаболитов (заведующий к.х.н. Ш.Ш. Афиятуллоев) из бактерий и грибов выделили несколько десятков химических соединений с необычной структурой и биологической активностью, в том числе противораковой. Обнаружение новых вторичных метаболитов, обладающих биологической активностью, открывает перспективы их дальнейшего использования в самых различных областях – от биомедицины до сельского хозяйства.

Исследования морских микроорганизмов таят в себе неисчерпаемые возможности. Здесь можно прогнозировать быстрые и важные достижения для социально-экономического прогресса общества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киричук Н.Н., Пивкин М.В. Вторичные морские грибы, ассоциированные с бурыми водорослями рода *Sargassum* залива Петра Великого (Японское море) // Микология и фитопатология. 2015. Т.49, № 3. С. 146–150.
2. Киричук Н.Н., Пивкин М.В. Мицелиальные грибы морской травы *Zostera marina* Linnaeus, 1753 бухты Рифовой (залив Петра Великого, Японское море) // Биол. моря. 2015. Т. 41, № 5. С. 319–323.
3. Ivanova E.P., López-Pérez M., Webb H.K., Ng H.J., Dang T.H.Y., Zhukova N.V., Mikhailov V.V., Crawford R.J., Rodriguez-Valera F. *Thalassospira australica* sp. nov. isolated from sea water // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. 2016. Vol. 109, N 8. P. 1091–1100.

4. Kirichuk N.N., Pivkin M.V., Matveeva T.V. Three new *Penicillium* species from marine subaqueous soils // Mycological Progress. 2017. Vol. 16, N 1. P. 15–26.
5. Kurilenko V.V., Romanenko L.A., Isaeva M.P., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. *Winogradskyella algae* sp. nov., a marine bacterium isolated from the brown alga // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. 2019. Vol. 112, N 5. P. 731–739. – DOI: 10.1007/s104820181207-5 JCR, Scopus.
6. Nedashkovskaya O.I., Kухlevskiy A.D., Zhukova N.V., Kim S.B. *Amylibacter ulvae* sp. nov., a new alphaproteobacterium isolated from the Pacific green alga *Ulva fenestrata* // Archives of Microbiology. 2016. Vol. 198, N 3. P. 251–256.
7. Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Stenkova A.M., Kухlevskiy A.D., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. *Aquimarina algiphila* sp. nov., a chitin degrading bacterium isolated from the red alga *Tichocarpus crinitus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68, N 3. P. 892–898. – DOI: 10.1099/ijsem.0.002606.
8. Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Zhukova N.V., Lee J.-S., Mikhailov V.V. *Lacinutrix cladophorae* sp. nov., a flavobacterium isolated from the green alga *Cladophora stimpsonii*, transfer of *Flavirhabdus iliipiscaria* Shakeela et al. 2015 to the genus *Lacinutrix iliipiscaria* comb. nov. and emended description of the genus *Lacinutrix* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. Vol. 66, N 11. P. 4339–4346.
9. Nedashkovskaya O.I., Van Trappen S., Zhukova N.V., De Vos P. *Lutibacter holmesii* sp. nov., a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, and emended description of the genus *Lutibacter* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. Vol. 65, pt 11. P. 3991–3996.
10. Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Zhukova N.V., Mikhailov V.V. *Olleya algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the green alga *Ulva fenestrata* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67, pt. 7. P. 2205–2210.
11. Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Balabanova L.A., Zhukova N.V., Bakunina I.Y., Mikhailov V.V. *Polaribacter staleyii* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68, N 2. P. 623–629. – DOI: 10.1099/ijsem.0.002554.
12. Nedashkovskaya O.I., Kухlevskiy A.D., Zhukova N.V., Kim S.-J., Rhee S.-K., Mikhailov V.V. *Winogradskyella litoriviva* sp. nov., isolated from coastal seawater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. Vol. 65, pt 10. P. 3652–3657.
13. Romanenko L.A., Kurilenko V.V., Guzev K.V., Svetashev V.I. Characterization of *Labrenzia polysiphoniae* sp. nov. isolated from red alga *Polysiphonia* sp. // Archives of Microbiology. 2019. Vol. 201, N 5. P. 705–712. Bibliogr.: 30 ref. – DOI: 10.1007/s00203-019-01640-0.
14. Romanenko L.A., Kurilenko V.V., Chernysheva N.Yu., Kalinovskaya N.I., Dmitrenok P.S., Popov R.S., Mikhailov V.V. Diversity and antimicrobial activity of hydrobionts associated microorganisms from the Sea of Japan with the occurrence of tropodithietic acid producing bacteria // Microbiol. Res. J. Int. 2017. Vol. 20, N 6. P. 1–14.
15. Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Kurilenko V.V., Mikhailov V.V. *Flavobacterium maris* sp. nov. isolated from shallow sediments of the Sea of Japan // Archives of Microbiology. 2015. Vol. 197, N 7. P. 941–947.
16. Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. *Pseudomonas glareae* sp. nov., a marine sediment-derived bacterium with antagonistic activity // Archives of Microbiology. 2015. Vol. 197, N 5. P. 693–699.
17. Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. *Rheinheimera japonica* sp. nov., a novel bacterium with antimicrobial activity from seashore sediments of the Sea of Japan // Archives of Microbiol. 2015. Vol. 197, N 4. P. 613–620.
18. Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. *Sphingorhabdus pacificus* sp. nov., isolated from sandy sediments of the Sea of Japan seashore // Archives of Microbiol. 2015. Vol. 197, N 2. P. 147–153.
19. Romanenko L.A., Kurilenko V.V., Guzev K.V., Svetashev V.I., Mikhailov V.V. *Winogradskyella profunda* sp. nov. isolated from the Chukchi Sea bottom sediments // Archives of Microbiol. 2019. Vol. 200, N 7. P. 45–50. – DOI.org/10.1007/s00203-018-1567-2.

В.Л. НОВИКОВ, Н.Н. БАЛАНЕВА, О.П. ШЕСТАК, В.П. ГЛАЗУНОВ

Возможные направления реакций 2-гидроксиафтазаринов разного структурного типа с триэфирами ортокарбоновых кислот

Рассмотрены механизмы термических реакций 2-гидроксиафтазаринов с заместителями и без заместителей в положении 3 с триэфирами ортокарбоновых кислот. Дано объяснение, почему реакции триметил- и триэтилортоформиатов с замещенными при C-3 субстратами ведут к образованию O-алкиловых эфиров, тогда как с незамещенными – к образованию смесей дибензо[b, h]ксантентетраонов и трис-(2-гидрокси-1,4-нафтохинон-3-ил)метанов. Объяснено также, почему реакции триметилортоацетата с субстратами любого структурного типа дают лишь O-метилловые эфиры.

Ключевые слова: 2-гидроксиафтазарин, O-алкилирование, триметил- и триэтилортоформиаты, триметилортоацетат, механизмы реакций, квантово-химические расчеты.

Possible directions of the reactions of different structural type 2-hydroxynaphthazarins with triethers of orthocarboxylic acids. V.L. NOVIKOV, N.N. BALANEVA, O.P. SHESTAK, V.P. GLAZUNOV (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

Analysis of the possible mechanisms of thermal reactions of 2-hydroxynaphthazarins, containing or not containing the substituents at the position 3, with triethers of orthocarboxylic acids gave an explanation for the facts why the reactions of trimethyl and triethyl orthoformates with substituted at C-3 substrates lead to the formation of O-alkyl ethers, whereas the reactions with unsubstituted at C-3 substrates provide the mixtures of dibenzo[b,h]xanthentetraones and tris-(2-hydroxy-1,4-naphthoquinon-3-yl)methanes. In the case of trimethyl orthoacetate, an explanation why its reactions with substrates of any one structural type produce only O-methyl ether was provided.

Key words: 2-hydroxynaphthazarins, O-alkylation, trimethyl and triethyl orthoformates, trimethyl orthoacetate, mechanisms of the reactions, quantum-chemical calculations.

O-Алкиловые эфиры гидроксиафтазаринов часто используются в различных физико-химических и синтетических исследованиях [1]. В ходе синтеза многих природных и родственных им (поли)гидроксиафтазаринов появляется необходимость защиты β-ОН-групп полупродуктов синтеза в виде O-алкиловых эфиров. Для этих целей пригодны различные реагенты [1], из которых наибольшее применение нашел diazometan. Ранее нами было показано, что триэфиры ортомуравьиной кислоты могут успешно заменять CH₂N₂ при O-алкилировании β-ОН-групп 2-гидроксиафтазаринов [3]. Этот метод, однако, дает хорошие результаты лишь с субстратами типа **1**, где R = алкил или хлор (рис. 1).

НОВИКОВ Вячеслав Леонидович – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, *БАЛАНЕВА Надежда Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ШЕСТАК Ольга Петровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, ГЛАЗУНОВ Валерий Петрович – кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: balaneva@piboc.dvo.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Дальний Восток» (грант № 18-4-021).

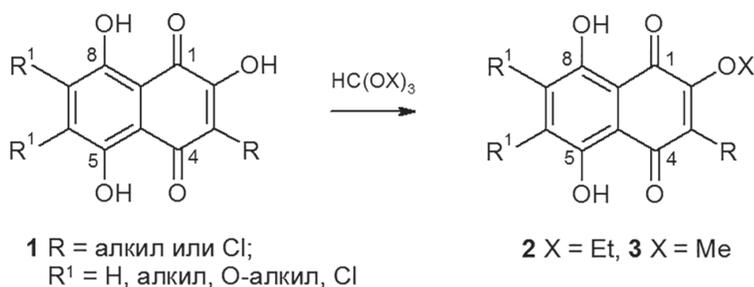


Рис. 1. O-Алкилирование субстратов типа **1** триалкилортоформиатами

Если же в субстрате **1** R = H, то O-эфиры **2** и **3** становятся минорными продуктами (выходы 2–9 %), а основными – димерные соединения: 14a-этокси-1,4,9,12-тетрагидрокси-14aH-дibenзо[*b,h*]ксантен-5,6,8,13(5*H*)-тетраоны типа **4** и 14a-метокси-1,4,9,12-тетрагидрокси-14aH-дibenзо[*b,h*]ксантен-5,6,8,13(5*H*)-тетраоны типа **5** с выходами 65–75 и 48–54 % соответственно (рис. 2).

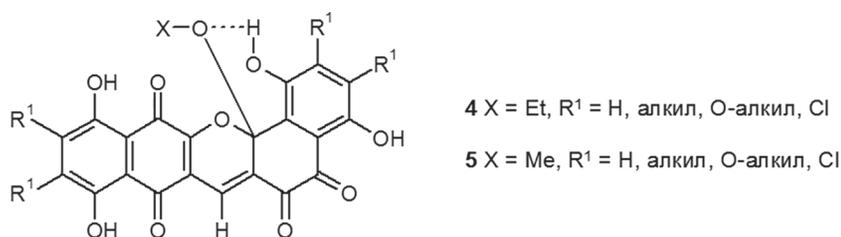


Рис. 2. Структуры алкилкеталей типа **4** и **5**

Помимо O-эфиров **2** и **3** среди минорных продуктов были обнаружены тримеры – трис-(2-гидрокси-1,4-нафтохинон-3-ил)метаны типа **6**, образующиеся с выходами 2–4 % (рис. 3).

Поскольку указанные реакции проводились в среде ортоэфиров при температурах кипения, различие в выходах O-алкилкеталей **4** и **5** объясняется значительной разницей температур кипения HC(OEt)₃ (143 °C) и HC(OMe)₃ (101 °C). При кипячении растворов субстратов типа **1** в смесях ортоэфиров с нейтральным растворителем (например, бензолом, 1,4-диоксаном или MeCN, 1 : 1 по объему) тримеры типа **6** становились основными продуктами (выходы 50–60 %), а выходы O-алкилкеталей типа **4** и **5** снижались до 15–20 %.

Удивительным фактом стало резкое изменение направления реакции при замене триалкилортоформиатов на триметилортоацетат. Кипячение растворов субстратов типа **1**, где R = H, в избытке MeC(OMe)₃ приводило к исключительному образованию метиловых эфиров типа **3** (выходы 79–89 %) [1] (рис. 1).

Вполне вероятно, что и субстраты типа **1** с заместителем при C-3, и субстраты этого типа без заместителя при C-3 будут реагировать с триалкилортоформиатами с образованием продуктов одного и того же типа, распадающихся далее либо с образованием эфиров типа **2** и **3**, либо алкилкеталей типа **4** и **5** и тримеров типа **6**.

Теоретически субстраты **1**, где R = H или Me, могут реагировать с триалкилортоформиатами в соответствии с тремя различными механизмами: ионным, радикальным и концертным (согласованным). На рис. 4 изображен ионный механизм реакции субстратов типа **1** с триметилортоформиатом.

Гетеролиз O-H связи C(2)-ОН-группы субстрата **1** в комплексе **1** с HC(OMe)₃ (ТМОФ) приводит к образованию аниона **A** и катиона **B-1** (рис. 4, уравнение 1). Анион **A**

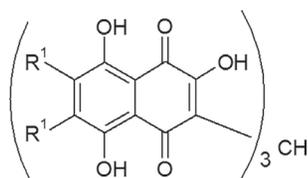


Рис. 3. Структуры тримеров типа **6**

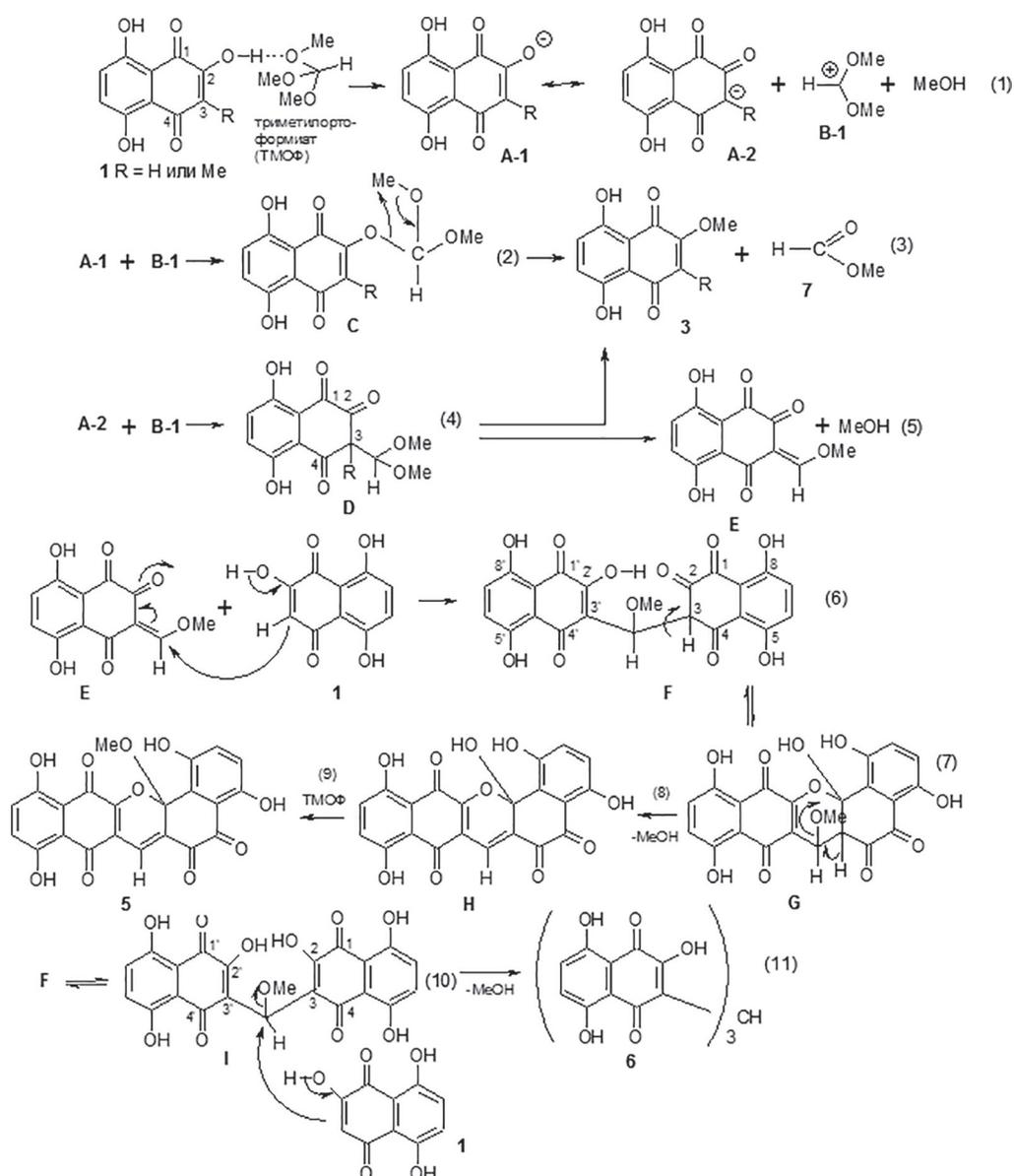


Рис. 4. Схема ионного механизма реакции субстратов типа 1 с триметилортоформиатом

представляет собой резонансный гибрид O-аниона **A-1** и C-аниона **A-2**, заряды на атомах O (-0,46) и C (-0,44) которого практически равны. Значит, взаимодействие их с катионом **B-1** будет равновероятным. Взаимодействие **A-1** с **B-1** даст смешанный ортоэфир **C** (уравнение 2), термическая перегруппировка которого приведет к образованию Me-эфира **3** и метилацетата **7** (уравнение 3). Взаимодействие **A-2** с **B-1** даст интермедиат **D** (уравнение 4). Если в интермедиате **D** R = Me, то его термический распад приведет к эфирам типа **3** (рис. 5).

Если же в интермедиате **D** R = H, то вышеприведенный распад будет выражен очень слабо, а доминирующим направлением будет элиминирование молекулы MeOH с образованием интермедиата **E** (уравнение 5) (рис. 6).

Сопряженное 1,4-присоединение субстрата **1** к эфиру **E** приведет к образованию димерного интермедиата **F** (уравнение 6), представляющего собой енольную форму

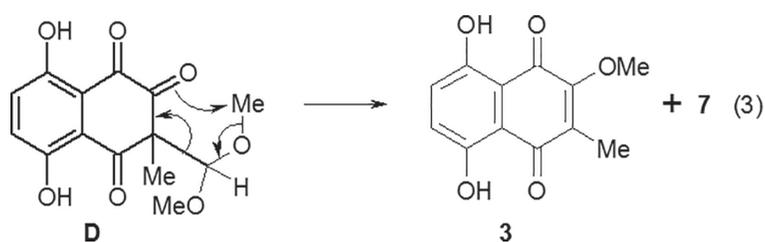


Рис. 5. Конверсия интермедиата **D** в метиловые эфиры типа **3**

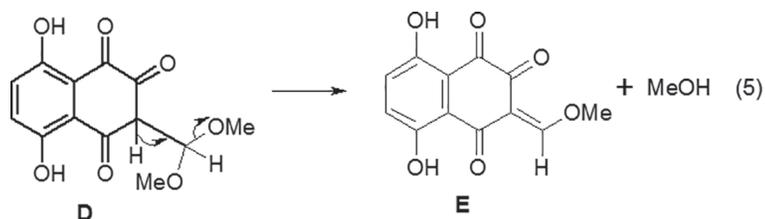


Рис. 6. Конверсия интермедиата **D** в интермедиат **E**

1,5-дикетона (цепочка атомов C(2)'-C(3)'-C(9)-C(3)-C(4)). Как известно, 1,5-дикетоны склонны к проявлению кольчато-цепной таутомерии [2]. Цепной таутомер **F**, переходя в кольчатый таутомер **G** при повороте трикетофрагмента вокруг связи C(9)-C(3) (уравнение 7), теряет при этом молекулу MeOH (уравнение 8). Этерификация полукетально-го интермедиата **H** под действием ТМОФ завершит процесс образования алкилкеталей типа **5** (уравнение 9).

Разбавление ортоэфира бензолом или другим нейтральным растворителем (1,4-диоксаном, MeCN) понижает полярность среды и способствует переходу кетоформы интермедиата **F** в енольную форму **I** (уравнение 10), не склонную к таутомеризации с образованием полукеталей типа **G**. Этому препятствуют, вероятно, связывание протонов C(2)-ОН-групп обоих нафтазарининовых фрагментов структуры **I** внутримолекулярными водородными связями с MeO-группой, а также понижение положительного заряда на атоме углерода C(4)=O группы за счет электронодонорного эффекта C(2)-ОН-группы. Атака электрофильного центра C(9) интермедиата **I** со стороны молекулы субстрата **1** ведет к образованию тримеров типа **6** (уравнение 11).

На рис. 7 изображен радикальный механизм реакции субстратов типа **1** с триметилортоформиатом.

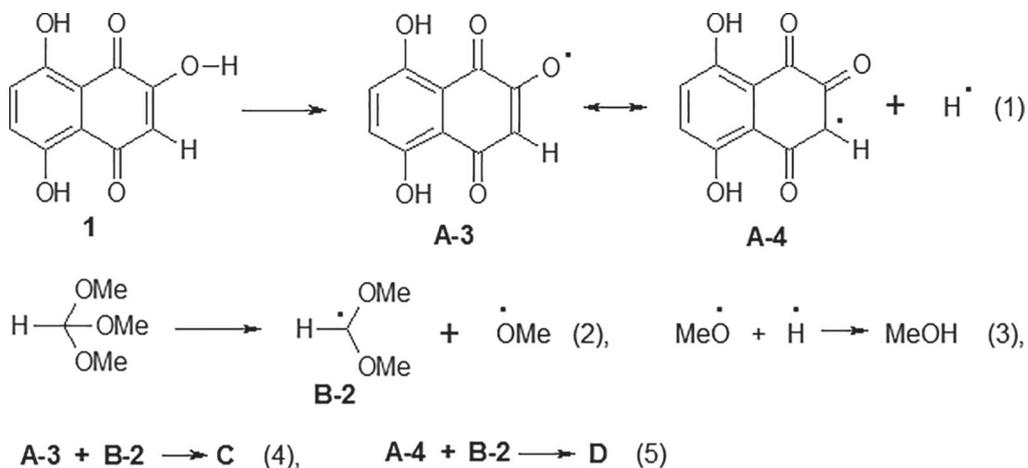


Рис. 7. Схема радикального механизма реакции субстратов типа **1** с ТМОФ

Гомолиз О-Н связи С(2)-ОН-группы субстрата **1** дает радикал **A**, являющийся резонансным гибридом О-радикала **A-3** и С-радикала **A-4** (рис. 7, уравнение 1). В отличие от анионов **A-1** и **A-2** (рис. 4), доминирующий вклад в этот гибрид вносит С-радикал **A-4**, поскольку спиновая плотность на атоме С-3 (+0,71) в 2,2 раза больше, чем на атоме О **A-1** (+0,32). Гомолиз С-О связи ортоэфира дает радикал **B-2** (уравнение 2).

Радикальное объединение **A-3** и **B-2** дает интермедиат **C** (уравнение 4), превращающийся далее в эфиры **3** и **7** (см. рис. 4), а объединение **A-4** и **B-2** – интермедиат **D** (уравнение 5), превращения которого в продукты типа **5** и **6** представлены на рис. 4.

На рис. 8 изображен концертный механизм реакции субстратов типа **1** с триметилортоацетатом.

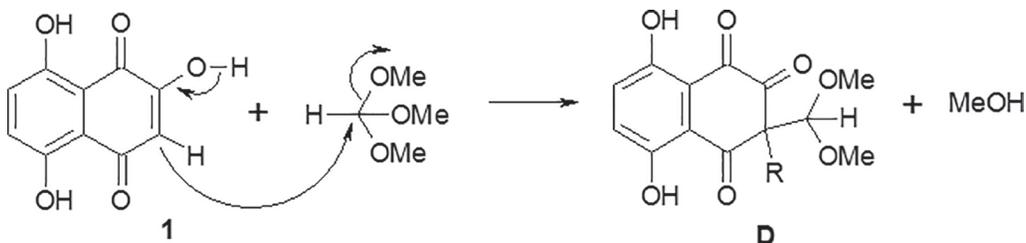


Рис. 8. Схема концертного механизма реакции субстратов типа **1** с ТМОФ

Согласованный сдвиг электронных плотностей связей, показанный на приведенной схеме (рис. 8), должен приводить к образованию интермедиата **D**, дальнейшие превращения которого рассмотрены в схеме ионного механизма (рис. 4).

Как видно из обсуждения возможных механизмов реакций субстратов типа **1** с триалкилортоформиатами, интермедиаты типа **D**, в которых скелет субстрата связан С-С связью с фрагментом ортоэфира, вполне могут быть ключевыми интермедиатами синтеза как эфиров типа **2** и **3**, так и более сложных продуктов типа **4–6**.

Нами проведена оценка энергий Гиббса начальных стадий реакций каждого из механизмов, ведущих к образованию ключевого интермедиата **D**, где R при С-3 равен H. Квантово-химические расчеты проводились с помощью программного пакета Gaussian 09 [4] с использованием метода функционала плотности DFT с функционалом B3LYP. В расчетах использовались базисы B3LYP/6-311(d), PCM/MeCN и B3LYP/6-311++(d,p), PCM/MeCN, дополненные моделью поляризованного континуума (PCM).

Расчеты суммарных величин $\Delta H_{\text{реак}}$ обсуждаемых стадий реакций, ведущих к интермедиату **D**, показали, что для ионного механизма она составляет +15,9, для радикального – -14,5, а для концертного – +15,4 ккал/моль. Как видно, радикальный механизм значительно выгоднее других, поскольку процесс образования интермедиата **D** в этом случае является экзотермическим.

Наконец, вопрос о том, почему триметилортоацетат при взаимодействии с субстратом **1**, где R = H, дает лишь метиловый эфир **3**, но не продукты типа **5** и **6**, разрешается, по-видимому, следующим образом. В ионном механизме этот ортоэфир должен превращаться в катион типа **B-3**, а в радикальном – в радикал типа **B-4** (рис. 9).

Катионы **B-1** (рис. 4) и **B-3** (рис. 9) имеют плоское строение (за исключением протонов Me-групп), как и взаимодействующие с ними анионы **A-1** и **A-2** (рис. 4). Поскольку взаимодействие этих реагентов происходит в параллельных плоскостях, в которых расположен каждый из них, то стерические препятствия играют решающую роль в возможности сближения этих плоскостей на расстояние, благоприятное для образования С-С связи по положению 3 субстрата **A-2**. В случае катиона **B-1** (рис. 4) образование

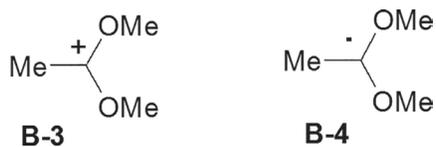


Рис. 9. Структуры катиона **B-3** и радикала **B-4**

такой связи возможно, а в случае катиона **В-3** – нет, поскольку сближению реагентов на требуемое расстояние мешают стерические взаимодействия протонов Me-групп катиона **В-3** с элементами структуры аниона **А-2**. При взаимодействии же катиона **В-3** с атомом кислорода аниона **А-1** этих стерических взаимодействий не наблюдается, что и определяет протекание реакций субстратов типа **1**, где R = H, с триметилортоацетатом исключительно по атому кислорода C(2)-ОН-группы.

Это объяснение вполне применимо и в случае радикального механизма реакции радикала **В-4** (тоже плоского, как и катион **В-3**) с С-радикалом **А-4** (рис. 7). Эти реагенты не могут быть связаны С-С связью по положению 3 радикала **А-4**, и реакция радикала **В-4** реализуется только с О-радикалом **А-3**. Концертный механизм реакций субстратов типа **1** с MeC(OMe)₃ вообще невозможен.

Таким образом, компьютерное моделирование реакции 2-гидроксинафтазаринов разного структурного типа с триметилортоформиаем и триметилортоацетатом и квантово-химические расчеты величин $\Delta H_{\text{реак}}$ начальных стадий этих реакций, протекающих по трем возможным механизмам, позволили объяснить, почему эти реакции могут протекать по различным направлениям и приводить к образованию сильно различающихся по своему строению продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баланева Н.Н., Шестак О.П., Новиков В.Л. Триметилортоацетат – удобный реагент для селективного метилирования β -ОН-групп (поли)гидроксинафтазаринов // Изв. АН. Серия хим. 2019. № 1. С. 55–63.
2. Высоцкий В.И., Каминский В.А., Акимова Т.И., Слабко О.Ю., Андин А.Н., Багрина Н.П. 1,5-Дикарбонильные соединения в органическом синтезе. Владивосток: Дальневост. федер. ун-т, 2014. 390 с.
3. Anufriev V.Ph., Novikov V.L., Malinovskaya G.V., Glazunov V.P. A convenient method for the selective alkylation of β -OH groups of 2(3)-hydroxyjuglones and hydroxynaphthazarines // Synth. Commun. 1997. Vol. 27. P. 119–126.
4. Revision A. 2nd ed. Wallingford, CT: Gaussian Inc., 2009.

Е.А. ЮРЧЕНКО, А.Н. ЮРЧЕНКО, Д.Л. АМИНИН

Морские экспедиции ТИБОХ ДВО РАН в Южно-Китайское море (2004–2018 гг.)

Представлена информация о результатах совместных российско-вьетнамских морских экспедициях за последние 15 лет.

Ключевые слова: морские экспедиции, природные соединения.

Marine expeditions of PIBOC FEB RAS in the South China Sea (2004–2018). E.A. YURCHENKO, A.N. YURCHENKO, D.L. AMININ (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The information about results of the joint Russian-Vietnamese marine expeditions during the last 15 years is presented in the review.

Key words: marine expeditions, natural compounds.

Основная цель большинства морских экспедиций Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН – изучение химического разнообразия вторичных метаболитов морских беспозвоночных, водорослей, низших грибов и бактерий и их биологической активности.

Первая совместная российско-вьетнамская экспедиция в Южно-Китайское море на борту НИС «Академик Опарин» была проведена в 2004–2005 гг. в соответствии с Соглашением о научном сотрудничестве между Российской академией наук и Вьетнамской академией наук и технологий от 01.12.2002 г. (предыдущая тропическая экспедиция была в 1991 г.). В экспедиции принимали участие ведущие ученые ТИБОХ ДВО РАН, которыми было собрано 287 образцов морских беспозвоночных животных. Этанольные экстракты проб протестированы на наличие цитотоксической, иммуностимулирующей, кардиостимулирующей, гепатозащитной активности (всего девять биотестов). Большинство экстрактов показало цитотоксическое действие, затем они использовались для выделения индивидуальных соединений.

В дальнейшем было организовано еще пять экспедиций (2007, 2010, 2013, 2016–2017, 2018 гг.), в которых ученые ТИБОХ собрали около 2000 образцов беспозвоночных животных. Также были взяты пробы бурых и красных водорослей, морской воды, грунта, различных организмов для выделения морских бактерий и грибов. Добытые материалы использовали для последующих биохимических исследований, пополнения музейных фондов и Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН.

Береговая линия Вьетнама растянута на более чем 3200 км от Сиамского залива на юге (8° N) до границы с Китаем на севере (23° N). Прибрежная акватория (с глубинами до 50 м) Вьетнама занимает площадь около 206 000 км² и включает в себя примерно 3000 крупных и мелких островов [10]. Маршруты экспедиций различались от года к

*ЮРЧЕНКО Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, ЮРЧЕНКО Антон Николаевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, АМИНИН Дмитрий Львович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: dminae@mail.ru

году в зависимости от длительности рейсов, погодных условий и конкретных задач каждой из них. Самые исследованные к настоящему времени – заливы Ванфонг и Нячанг, острова Катба, Ре (Лисон), Кондао, Тху, Тхотю, Намзу, Фукуок. Осуществлялись заходы в порты Нячанг, Дананг и Хайфон для принятия на борту групп вьетнамских исследователей (и их высадки по завершению работ), проведения совместных конференций и семинаров [1–3].

Неизменным партнером ТИБОХ ДВО РАН в проведении экспедиций является Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН. Его сотрудники изучают коралловые сообщества Вьетнама, ихтиофауну, липидный состав кораллов. В 2013 г. в экспедиции работали коллеги из Тихоокеанского института географии ДВО РАН. С вьетнамской стороны в совместных экспедициях регулярно принимают участие ученые из институтов Вьетнамской академии наук и технологий: Института океанографии, Института морской окружающей среды и ресурсов, Института морской биохимии, Нячангского института научных исследований и прикладных технологий, Института химии природных соединений, Вьетнамского института нефти, – а также различных эколого-мониторинговых организаций.

Научно-исследовательское судно «Академик Опарин» оснащено водолазным (включая компрессоры и барокамеру) и специализированным химическим и биохимическим (дистиллятор, общесудовая система подачи вакуума, система вытяжных шкафов, жидкостный хроматограф высокого давления) оборудованием. Это позволяет не только собирать и сохранять образцы морских организмов, но и проводить химические и биохимические исследования непосредственно на борту судна. В микробиологической лаборатории созданы все условия для выделения штаммов морских микроорганизмов. Наличие на борту судна лаборатории биоиспытаний и вивария позволяет проводить во время экспедиций тестирование экстрактов различных объектов и их фракций на животных, обнаруживать различные виды биологической активности.

В результате шести совместных российско-вьетнамских экспедиций в течение 15 лет из морских животных (губки, офиуры, асцидии, голожаберные моллюски, горгонарии, голотурии, морские звезды) и мицелиальных грибов (*Penicillium*, *Isaria (Beauveria)*) выделено более 250 низкомолекулярных метаболитов, включая 117 новых.

Губка *Penares* sp. (коллекционный номер О30-271), собранная траловым способом на глубине 95 м (16°07' N, 114°47' E), оказалась продуцентом целого ряда интересных метаболитов. Старшие научные сотрудники к.х.н. Е.Г. Ляхова и С.А. Колесникова выделили из ее экстрактов новые бромсодержащие алкалоиды 7-бромо-1-(6-бромо-1Н-индол-3-ил)-9Н-карбазол и 3,11-дигбромо-13Н-индоло[3,2-к]фенантридин [11], шесть новых терпеноидов и ранее известные пенастерон, ацетилпенастерол и эргоста-4,24(28)-диен-3-он [9], обладающие разной степенью цитотоксической активности. Следует отметить, что скелетные системы изученных алкалоидов ранее известны не были, а сами эти соединения являются, таким образом, первыми представителями новых групп алкалоидов. Кроме того, в этом же биологическом объекте обнаружено восемь новых окисленных ланостановых и норланостановых производных [12].

Несколько производных ааптамина, включая три новые, выделила в.н.с. к.х.н. Л.К. Шубина из губки *Aptos* sp., собранной в экспедиции 2004–2005 гг. в бухте Ванфонг (12°35'68" N, 109°18'62" E). Все соединения проявили канцер-превентивную активность, а также проапоптотические свойства [14]. В другом образце губки *Aptos* sp. (коллекционный номер О34-064), поднятом на борту в следующей экспедиции в 2007 г., были найдены три новых соединения – 2,3-дигидро-2,3-диоксоааптамин, 6-(N-морфолинил)-4,5-дигидро-5-оксодеметил-(гидрокси)ааптамин и 3-(метиламино)деметил(окси)ааптамин, вызывающие апоптоз в клетках моноцитов человека ТНР-1 [16]. С.н.с. к.х.н. Н.К. Уткина из губки *Aptos aptos*, добытой у о-ва Тхотю (09°18' N, 103°29'583 E), выделила N-деметилааптанон [18].

Губка *Neopetrosia* sp. из района у о-ва Конко является, как установили в.н.с. к.х.н. Л.К. Шубина и г.н.с. д.х.н. Т.Н. Макарьева, продуцентом неопетрозидов А и В. Это первые представители нового класса пиридиновых α -рибозидов никотиновой кислоты с чрезвычайно редкими N-гликозидными связями и остатками р-гидроксibenзойной и пиррол-2-карбоновой кислот [15]. Неопетрозид А усиливал работу митохондрий (включая активацию окислительных процессов и повышение уровня митохондриального АТФ) мышечных миоцитов линии C2C12.

Из морской звезды *Linckia laevigata*, обитавшей в бухте Ванфонг на глубине 5–10 м, в.н.с. д.х.н. А.А. Кича с коллегами получили новые стероиды линкозиды L1–L7, а также несколько уже известных соединений [6–8]. Линкозиды имеют 2-O-метил- β -D-ксилопиранозный фрагмент при атоме С-3 полигидроксилированного агликона и различаются между собой структурой стероидного ядра. Линкозиды L1 и L2 показали способность влиять на нейрональную дифференциацию клеток нейробластомы C-1800, а линкозиды L3, L6 и L7 проявили цитотоксическую активность в отношении яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*.

Из экстракта морской звезды *Anthenea aspera* с.н.с. к.х.н. Т.В. Маляренко выделил десять новых полигидроксилированных гликозидов, антенозиды L–U с редким положением углеводного фрагмента [13]. Антенозид О на 24 % уменьшал содержание активных форм кислорода в клетках макрофагов, предварительно стимулированных LPS, т.е. оказывал противовоспалительное действие.

Источником ряда новых тритерпеновых гликозидов стали собранные во вьетнамских водах голотурии. Так, неотнионидозид С был выделен в.н.с. д.х.н. С.А. Авиловым и соавторами из этанольного экстракта голотурии *Neothyonidium magnum* [4], а два новых тритерпеновых голостановых гликозида, синаптозиды А и А1, – из экстракта голотурии *Synapta maculata*, собранной в бухте Ванфонг. Синаптозид А показал заметную цитотоксическую активность в отношении клеток линии HeLa [5].

Серия новых высокоокисленных хроменовых производных, оксирапентины В–D, Е, F–K, новый исарикетид (поликетид), новый бензофуранакремин S и два известных циклодепептида изоисариин В и исаридин Е были обнаружены группой сотрудников ТИБОХ под руководством заведующего лабораторией морских микробных метаболитов к.х.н. Ш.Ш. Афиятуллова в экстракте гриба *Isaria felina* КММ 4639 из морского грунта зал. Ванфонг [17, 20, 21]. Исарикетид обладал цитотоксической активностью в отношении клеток линий ТНР-1 и HL-60, но был нетоксичен в отношении нетрансформированных спленоцитов мышей линии CD-I, что делает его весьма интересным для дальнейшего исследования [21].

Всего по результатам экспедиций к настоящему времени выделены соединения таких химических классов, как церебозиды и другие производные жирных кислот, полигидроксилированные стероиды (всего 19 соединений), сульфатированные стероиды (3), стероидные гликозиды (44), сульфатированные стероидные гликозиды (31) и другие стероиды (29), сесквитерпеноиды (4), хроменовые (12) и другие поликетиды (19), бромтирозиновые производные (38), изотиоцианаты и их производные (5), дикетопиперазиновые алкалоиды (19), ааптаминоподобные алкалоиды (20) и другие алкалоиды (13), депептиды (2) и нуклеозиды (4) [19].

Следует заметить, что, кроме выделения биологически активных метаболитов, в результате экспедиций были получены и другие важные научные результаты, в том числе пополнены коллекции морских макро- и микроорганизмов, выделены аксенические штаммы морских бактерий и грибов, описаны морские сообщества из различных акваторий и т.д.

Работа с биологическим материалом, собранным в экспедициях, продолжается, и можно ожидать появления еще большого числа новых веществ, обладающих ценной биологической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юрченко Е.А., Амнин Д.Л. 45-я комплексная экспедиция на НИС «Академик Опарин» в территориальные воды Вьетнама (апрель–июнь 2013 г.) // Вестн. ДВО РАН. 2014. № 1. С. 184–188.
2. Юрченко Е.А., Маляренко Т.В. Совместная российско-вьетнамская экспедиция № 49 в Южно-Китайском море на борту НИС «Академик Опарин» (ноябрь 2016 – январь 2017) // Вестн. ДВО РАН. 2017. № 4. С. 154–158.
3. Юрченко Е.А., Юрченко А.Н. Совместная российско-вьетнамская экспедиция № 50 в Южно-Китайском море на НИС «Академик Опарин» (июнь–август 2018) // Вестн. ДВО РАН. 2018. № 5. С. 153–157.
4. Avilov S.A., Kalinovskii A.I., Stonik V.A. New triterpene glycoside from the holothurian *Neothyonidium magnum* // Chem. Nat. Compd. 1990. Vol. 26, N 1. P. 42–45.
5. 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. Synaptosides A and A1, triterpene glycosides from the sea cucumber *Synapta maculata* containing 3-*O*-methylglucuronic acid and their cytotoxic activity against tumor cells // J. Nat. Prod. 2008. Vol. 71, N 4. P. 525–531.
6. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Sokolova E.V., Agafonova I.G., Morre J., Stonik V.A. Four new steroid glycosides from the Vietnamese starfish *Linckia laevigata* // Russ. Chem. Bull. 2007. Vol. 56, N 4. P. 823–830.
7. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovskii A.I., Dmitrenok P.S., Palyanova N.V., Pankova T.M., Starostina M.V., Gavagnin M., Stonik V.A. New neurotogenic steroid glycosides from the Vietnamese starfish *Linckia laevigata* // Nat. Prod. Commun. 2007. Vol. 2, N 1. P. 41–46.
8. Kicha A.A., Ivanchina N.V., Kalinovskii A.I., Dmitrenok P.S., Sokolova E.V., Agafonova I.G. Sulfated steroid glycosides from the Vietnamese starfish *Linckia laevigata* // Chem. Nat. Compd. 2007. Vol. 43, N 1. P. 76–80.
9. Kolesnikova S.A., Lyakhova E.G., Kalinovskiy A.I., Pushilin M.A., Afiyatullof S.S., Yurchenko E.A., Dyshlovoi S.A., Minh C.V., Stonik V.A. Isolation, structures, and biological activities of triterpenoids from a *Penares* sp. marine sponge // J. Nat. Prod. 2013. Vol. 76, N 9. P. 1746–1752.
10. Latypov Yu.Ya. Reef-Building Corals of Vietnam as a Part of the Indo-Pacific Reef Ecosystem // Russ. J. Mar. Biol. 2005. Vol. 31, suppl. 1. P. S34–S40.
11. Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovskiy A.I., Afiyatullof S.S., Dyshlovoi S.A., Krasokhin V.B., Minh C.V., Stonik V.A. Bromine-containing alkaloids from the marine sponge *Penares* sp. // Tetrahedron Lett. 2012. Vol. 53, N 45. P. 6119–6122.
12. Lyakhova E.G., Kolesnikova S.A., Kalinovskiy A.I., Dmitrenok P.S., Nam N.H., Stonik V.A. Further study on *Penares* sp. from Vietnamese waters: minor lanostane and *nor*-lanostane triterpenes // Steroids. 2015. Vol. 96. P. 37–43.
13. Malyarenko T.V., Kharchenko S.D., Kicha A.A., Ivanchina N.V., Dmitrenok P.S., Chingizova E.A., Pisyagin E.A., Evtushenko E.V., Antokhina T.I., Minh C.V., Stonik V.A. Anthenosides L–U, steroidal glycosides with unusual structural features from the starfish *Anthenea aspera* // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79, N 12. P. 3047–3056.
14. Shubina L.K., Kalinovskiy A.I., Fedorov S.N., Radchenko O.S., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoi S.A., Krasokhin V.B., Stonik V.A. Aaptamine alkaloids from the Vietnamese sponge *Aaptos* sp. // Nat. Prod. Commun. 2009. Vol. 4, N 8. P. 1085–1088.
15. Shubina L.K., Makarieva T.N., Yashunsky D.V., Nifantiev N.E., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Dyshlovoi S.A., Fedorov S.N., Krasokhin V.B., Jeong S.H., Han J., Stonik V.A. Pyridine nucleosides neopetrosides A and B from a marine *Neopetrosia* sp. sponge. Synthesis of neopetroside A and its beta-riboside analogue // J. Nat. Prod. 2015. Vol. 78, N 6. P. 1383–1389.
16. Shubina L.K., Makarieva T.N., Dyshlovoi S.A., Fedorov S.N., Dmitrenok P.S., Stonik V.A. Three new aaptamines from the marine sponge *Aaptos* sp. and their proapoptotic properties // Nat. Prod. Commun. 2010. Vol. 5, N 12. P. 1881–1884.
17. Smetanina O.F., Yurchenko A.N., Afiyatullof S.S., Kalinovskiy A.I., Pushilin M.A., Khudyakova Y.V., Slinkina N.N., Ermakova S.P., Yurchenko E.A. Oxirapentyns B–D produced by a marine sediment-derived fungus *Isaria felina* (DC.) Fr. // Phytochem. Lett. 2012. Vol. 5, N 1. P. 165–169.
18. Utkina N.K., Denisenko V.A. N-Demethylaaptanone, a new congener of aaptamine alkaloids from the Vietnamese marine sponge *Aaptos aaptos* // Nat. Prod. Commun. 2016. Vol. 11, N 9. P. 1259–1260.
19. Yurchenko E.A., Yurchenko A.N., Minh C.V., Aminin D.L. Achievements in the study of marine low-molecular weight biologically active metabolites from the Vietnamese territorial waters as a result of expeditions aboard the research vessel “Akademik Oparin” (2004–2017) // Chem. Biodivers. 2019. Vol. 16. P. e1800654.
20. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Khudyakova Yu.V., Kirichuk N.N., Chaikina E.L., Anisimov M.M., Afiyatullof S.S. New oxirapentyn E from marine isolate of the fungus *Isaria felina* // Chem. Nat. Compd. 2013. Vol. 49, N 5. P. 857–860.
21. Yurchenko A.N., Smetanina O.F., Kalinovskiy A.I., Pushilin M.A., Glazunov V.P., Khudyakova Y.V., Kirichuk N.N., Ermakova S.P., Dyshlovoi S.A., Yurchenko E.A., Afiyatullof S.S. Oxirapentyns F–K from the marine-sediment-derived fungus *Isaria felina* KMM 4639 // J. Nat. Prod. 2014. Vol. 77, N 6. P. 1321–1328.

М.И. КУСАЙКИН

Морские природные соединения как активные компоненты эффективных лекарств, БАД, функциональных продуктов питания и косметических средств

Приведены сведения о некоторых фармацевтических субстанциях, лекарственных средствах, биологически активных добавках и функциональных продуктах питания, разработанных на основе морских природных соединений в ТИБОХ ДВО РАН.

Ключевые слова: Гистохром, Максар, Коллагеназа КК, Фуколам, Митилан, Кумазид.

Marine natural compounds as active components of effective medicines, dietary supplements, functional foods and cosmetics. M.I. KUSAYKIN (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The article provides information on some pharmaceutical substances, medicines, food supplements and functional foods developed on the basis of marine natural compounds in PIBOC FEB RAS.

Key words: Histichrome, Maxar, Collagenase KK, Fucolam, Mitilan, Cumaside.

Дальний Восток России располагает богатейшими уникальными сырьевыми ресурсами для создания в регионе промышленного производства биологически активных веществ. Использование современных наукоемких технологий переработки биологических ресурсов в хозяйственном комплексе региона, ориентированном сегодня преимущественно на вывоз сырья, туризм, судоремонт и рыболовство, позволит более рационально и экономически целесообразно использовать природные богатства России.

Морские организмы и уникальные объекты дальневосточной флоры все в большей мере привлекают внимание в качестве источника необычных по химическому строению и биологической активности природных соединений. Десятки исследовательских центров во всем мире изучают такие вещества. Быстро развиваются и биотехнологические работы, направленные на создание новых способов получения лекарственных и профилактических препаратов, а также пищевых добавок из природного сырья.

Основная цель прикладных работ, проводимых в ТИБОХ ДВО РАН, – разработка научных основ для развития на Дальнем Востоке России современной отрасли промышленности по производству оригинальных фармсубстанций и лекарственных средств на их основе, сырья для производства биологически активных добавок и активных ингредиентов для продуктов функционального питания и косметических средств.

Одним из неоспоримых преимуществ института является возможность проводить работы полного цикла: от поиска активной молекулы, исследования ее структуры, разработки

методов синтеза, изучения биологической активности до создания технологий и выпуска готовых фармсубстанций и других препаратов на опытно-экспериментальной установке. За время существования института опытное производство выросло от небольшого технологического участка в главном здании до технологического комплекса, включающего старый химико-технологический участок, здание опытно-экспериментальной установки и технологический цех на Морской экспериментальной станции, где также расположена небольшая аквакультурная плантация.

Сейчас в распоряжении технологов имеются различные реакторы, экстракторы, испарители, аппараты для ультрафильтрации, капсулирования и таблетирования, система подготовки очищенной воды, участок готовых лекарственных форм, оснащенный специальной системой подготовки воздуха. Контрольно-аналитический отдел и отдел обеспечения качества, возглавляемый уполномоченным лицом по качеству лекарственных препаратов, ведут контроль над параметрами всех технологических процессов и соблюдением всех норм и правил, что позволяет осуществлять выпуск лекарственных субстанций в соответствии с правилами GMP, биологически активных добавок и пищевых продуктов – в соответствии с требованиями ХАССП. Группа инноваций и документационного обеспечения совместно с технологами и разработчиками обеспечивает создание нормативно-технической документации и ее регистрацию в уполномоченных государственных органах, осуществляет связь с органами Минпромторга и Минздрава.

В настоящее время на опытно-экспериментальном производстве функционируют линии получения фармацевтических субстанций «Эхинохром» и «Маакии амурской экстракт сухой». Полученные здесь фармсубстанции отправляют на фармзаводы, где получают готовые лекарственные формы: «Гистохром» (раствор для инъекций, 0,2 мг/мл), «Гистохром» (раствор для инъекций, 10 мг/мл), «Максар» (таблетки, покрытые пленочной оболочкой). Эти лекарственные препараты разработаны в лаборатории химии природных хиноидных соединений института.

Гистохром относится к антиоксидантным препаратам. Механизм его действия связан со способностью стабилизировать клеточные мембраны, взаимодействовать с активными формами кислорода, свободными радикалами, проявлять свойства хелатора металлов переменной валентности, стимулировать митохондриальные функции, усиливать биосинтез аденозинтрифосфата. Гистохром снижает количество продуктов перекисного окисления липидов в организме [1, 6].

Препарат «Максар» относится к группе гепатопротекторов растительного происхождения. Терапевтический эффект препарата обусловлен комплексом биологически активных веществ сухого экстракта из древесины маакии амурской, важнейшими из которых являются изофлавоны, птерокарпаны, мономерные и димерные транс-стильбены [2].

При разработке новых технологий могут быть использованы и другие технологические схемы. Наши инженеры и техники могут адаптировать работу технологического и вспомогательного оборудования практически под любой процесс.

Для выпуска опытной партии препарата «Кумазид», разработанного в лаборатории химии морских природных соединений и лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ, создана временная технологическая линия для разработки технологии получения этого препарата, который производится из дальневосточной промысловой голотурии Кукумария японская. Активным веществом препарата является кукумариозид А2-2. Он может взаимодействовать с пуриnergическими рецепторами иммунных клеток и запускать процессы, приводящие к активации иммунокомпетентных клеток и усилению защитных функций организма [3]. Испытания показали, что Кумазид в малых дозах повышает устойчивость к бактериальным инфекциям, обладает радиозащитным эффектом и способностью тормозить рост злокачественных новообразований у экспериментальных животных. Препарат не имеет аналогов.

Коллективом лаборатории химии пептидов и лаборатории биотехнологии разработана технология получения ферментного препарата «Коллагеназа КК» из гепатопанкреаса

краба. Препарат обладает коллагенолитической, эластолитической, трипсиновой и химо-трипсиновой активностью. Он избирательно действует на коллаген – основной компонент соединительной ткани, вызывая его деструкцию. Жизнеспособные ткани, грануляционная ткань и эпителий «Коллагеназой КК» не поражаются. При гнойных ранах «Коллагеназа КК» способствует быстрой эвакуации нежизнеспособных тканей и экссудата, раннему появлению грануляционной ткани, эпителизации. Применение препарата предупреждает развитие грубых (типа келоидных) рубцов, при этом сохраняются подвижность кожи и мягких тканей, функция суставов.

За 55-летнюю историю института было создано множество биологически активных добавок и функциональных продуктов питания. Например, хорошо известный сувенирный продукт нашего края «Уссурийский бальзам», серия безалкогольных бальзамов «Гербамарин», детоксикант «Зостерин», серия пищевых продуктов «Золотой рог» на основе приморского меда, фруктозный сироп с экстрактом морского ежа. Эти продукты разработаны при активном участии лаборатории биотехнологии.

Сейчас большое внимание уделяется продуктам переработки водорослей. Одним из успешных проектов лаборатории химии ферментов является разработка технологии комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для пищевой и косметической промышленности. Морские водоросли можно не только употреблять в пищу, но и использовать для получения различных лечебно-профилактических препаратов, пищевых, косметических и кормовых добавок. Водоросли содержат ряд веществ, обладающих биологической активностью: витамины, маннит, аминокислоты, стерины, микроэлементы, йодсодержащие органические соединения. Но наибольшую ценность представляют полисахариды, которые в зависимости от вида водоросли и стадии ее развития составляют 40–80 % от сухого веса. Результатом исследований явилось создание безотходных универсальных технологий переработки водорослей, имеющих различный полисахаридный состав, и создание на основе фукоидана из дальневосточной бурой водоросли *F. evanescens* серии биологически активных добавок «Фуколам» (Фуколам-С, Фуколам, Фуколам янтарный). Фуколам-С, являющийся сырьем для производства БАД серии «Фуколам», состоит из фукоидана (80–85 %) и полиманнурановой кислоты (15–20 %). Суть безотходной универсальной технологии заключается в последовательной экстракции низкомолекулярных соединений, водо- и щелочерастворимых полисахаридов различными растворителями при разных рН, что позволяет с наименьшими затратами получить в одном процессе индивидуальные полисахариды (ламинаран, фукоидан, водо- и щелочерастворимые альгинаты). Исследование биологической активности фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*, составляющего основу БАД серии «Фуколам», показало, 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 фукоидан и БАД серии «Фуколам» оказывают разнообразные физиологические эффекты, зависящие от дозы препарата и состояния клеток. Они стимулируют функциональную активность нейтрофилов и натуральных киллеров, проявляют свойства модуляторов продукции цитокинов (снижают исходно низкую и усиливают исходно высокую продукцию 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 [5]. Изучение биологической активности фукоидана, входящего в состав БАД серии «Фуколам», показало, что он также обладает антивирусной активностью по отношению к вирусу клещевого энцефалита и вирусу Хантаан, вызывающему геморрагическую лихорадку с почечным синдромом.

На основе полисахарида, полученного из красных водорослей, создан препарат «Каррагинан ДВ». Каррагинаны относятся к растворимым пищевым волокнам и широко используются в качестве пищевых ингредиентов различных продуктов, обладают широким спектром биологической активности. Наибольшие перспективы применения препарата

«Каррагинан ДВ» открываются в области стимулирования иммунного ответа или контролирования активности иммунных клеток, в частности смягчения таких негативных эффектов, как воспаление [6]. Применение каррагинана *per os* стимулирует продукцию муцина, который защищает эпителий пищеварительного тракта от разрушений. Как и фукоидан, каррагинан обладает противовирусной активностью.

Совместно с ИП «Сизова Н.В.» из Томска разработана и внедрена в производство серия натуральной косметики с использованием веществ, полученных из морских организмов.

Новую жизнь получил «Митилан», получаемый из выварочных вод мидий. «Митилан» представляет собой высокомолекулярный углеводно-белковый комплекс. Углеводный его компонент (90–95 %) является гликогенподобным 1,4; 1,6- 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. Белковый компонент (5–10 %) Митилана – галактозоспецифичный лектин. Исследования показали, что Митилан нетоксичен, не оказывает раздражающего и аллергического действия, обладает выраженным противовоспалительным и противонекротическим эффектами, а также способностью усиливать защитные иммунные реакции организма против бактериальных и вирусных инфекций, в частности против вируса гриппа. К настоящему времени накоплен обширный материал о физиологической активности Митилана и его полезных свойствах. Митилан получают из отходов переработки промыслового вида мидии. Процесс экологически безопасен и предусматривает комплексную переработку морского пищевого сырья.

Большое разнообразие структур морских полисахаридов, широкий спектр их биологического действия и практически отсутствие токсичности делают весьма перспективным разработку на их основе высокоэффективных средств для коррекции нарушений функционирования органов человека с целью минимизации влияния неблагоприятных факторов окружающей среды.

Некоторые из продуктов, ставшие очень популярными, наше производство выпускает под собственными торговыми марками фирм-заказчиков. Один из крупных заказчиков – фирма «Тианде» из г. Барнаул, для которой мы производим БАД «Фукоидан».

За последние пять лет разработано несколько новых продуктов. Так, совместно с ОАО «Приморский кондитер» разработан шоколад, функционализированный веществами, полученными из морских ежей и гребешка приморского. Вместе с Тихоокеанской инвестиционной группой (ТИГР) институт ведет разработку оригинальных продуктов с использованием корня женьшеня. Начат интересный проект с Международным центром здоровья и долголетия «Цырен».

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусева М.Р., Бесланеева М.Б. Клиническое обоснование эффективности применения антиоксидантного отечественного препарата «Гистохром» // Вестн. офтальмологии. 2010. № 3. С. 37–40.
2. Кулеш Н.И., Федорев С.А., Веселова М.В., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Момот Т.В. Влияние изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* на метаболические реакции печени при экспериментальном токсическом гепатите // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50, № 7. С. 21–27.
3. Aminin D.L., Chaykina E.L., Agafonova I.G., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside // Int. Immunopharmacol. 2010. Vol. 10, N 6. P. 648–654.
4. Kalitnik A.A., Karetin Y.A., Kravchenko A.O., Khasina E.I., Yermak I.M. Influence of carrageenan on cytokine production and cellular activity of mouse peritoneal macrophages and its effect on experimental endotoxemia // J. Biomed. Mater. Res. A. 2017. Vol. 105, N 5. P. 1549–1557.
5. Kuznetsova T.A., Kryzhanovskii S.P., Bogdanovich L.N., Besednova N.N. Effect of biologically active substances derived from hydrobionts of the Pacific Ocean on parameters of lipid metabolism during experimental hypercholesterolemia // Bull. Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 158, N 2. P. 188–191.
6. Park J.H., Lee N.-K., Lim H.J., Mazumder S., Kumar Rethineswaran V., Kim Y.-J., Jang W.B., Ji S.T., Kang S., Kim D.Y., Van L.T.H., Giang L.T.T., Kim D.H., Ha J.S., Yun J., Kim H., Han J., Mishchenko N.P., Fedoreyev S.A., Vasileva E.A., Kwon S.M., Baek S.H. Therapeutic cell protective role of histochrome under oxidative stress in human cardiac progenitor cells // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17. P. 368.

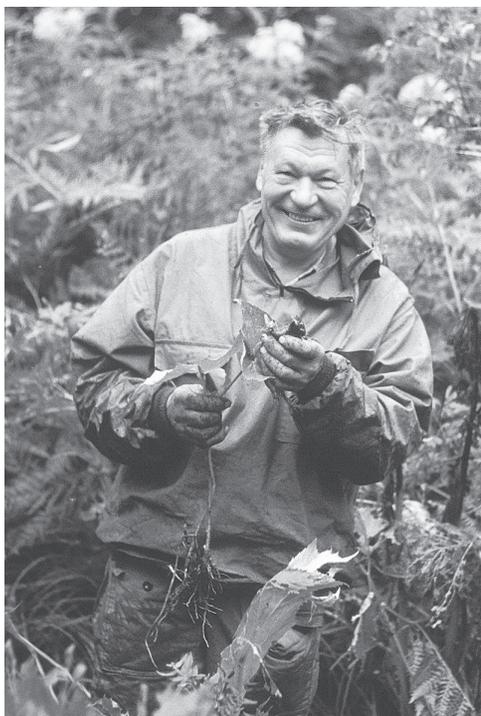
Академик РАН П.Г. Горовой – исследователь растений

Петр Григорьевич Горовой, единственный на сегодняшний день академик РАН по специальности «Ботаника», родился 13 декабря 1936 г. во Владивостоке, в семье учителя. Детство прошло в пос. Шкотово Приморского края, где в 1953 г. он окончил школу. Самые ранние годы пришлось на трудное и суровое военное время. Пока отец воевал на фронте против Японии, все тяготы и заботы о детях лежали на плечах мамы Петра Григорьевича. После окончания боевых действий отец привез из Северо-Восточного Китая в Приморский край декоративные и плодовые растения. Может, тогда у будущего академика и зародилась любовь к диковинным растениям, появилось желание изучать то, что было ему пока неизвестно.

Петр Григорьевич рос любознательным. Во время учебы в школе он собрал коллекцию яиц почти 100 видов птиц и гнезд. Для него лес с самого детства был родным домом, а природа – первым учителем и кормильцем. В голодные послевоенные годы он помогал отцу кормить семью, охотясь на фазанов, уток, куликов. С юного возраста будущего ученого привлекали к сбору клещей с животных (зайцев, енотов, енотовидных собак, барсуков, дальневосточных лесных котов, лисиц, косуль) для экспедиций по изучению клещевого энцефалита. Никто тогда не задумывался, насколько опасно поручать такое ребенку.

Повзрослев, Петр Григорьевич без колебаний выбрал себе профессию, неразрывно связанную с изучением природы. В 1953 г. он поступил на естественно-географический (биологический) факультет Благовещенского государственного педагогического института им. М.И. Калинина (ныне – Благовещенский государственный педагогический университет), который с отличием окончил в 1957 г.

Год после института П.Г. Горовой работал преподавателем биологии и химии в медицинском училище во Владивостоке, а затем проходил аспирантуру в Дальневосточном филиале Сибирского отделения Академии наук СССР (ДВФ СО АН СССР), был ленинским стипендиатом. После окончания аспирантуры работал в Биолого-почвенном институте ДВФ СО АН СССР в отделе ботаники под руководством геоботаника, профессора Павла Дионисьевича Ярошенко. Наставниками и учителями Петра Григорьевича были известные флористы и систематики высших растений: Дмитрий Петрович Воробьев (руководитель во время прохождения аспирантуры), Владимир Николаевич Ворошилов и Алексей Иванович Шретер, профессор Александр Иннокентьевич Толмачев.



Академик РАН П.Г. Горовой среди зарослей крестовника, 1998 г. Фото из архива П.Г. Горового

Результатом совместных с учителями исследований П.Г. Горового стал «Определитель растений Приморья и Приамурья» (1966 г.), которым до сих пор пользуются студенты вузов.

В 1963 г. П.Г. Горовой вместе с профессорами И.В. Грушвицким и И.И. Брехманом был командирован в Демократическую Республику Вьетнам для изучения флоры и лекарственных растений этой страны. В этой поездке внимание ученых привлекло такое растение, как калозант индийский (*Oroxylon indicum* L.), которое широко использовалось во вьетнамской народной медицине для лечения аллергии и ожогов. Позднее вещества, присутствующие в калозанте, были обнаружены в шлемнике байкальском (*Scutellaria baicalensis* Georgi), который в Советском Союзе был разрешен для лечения гипертонии. П.Г. Горовому удалось выяснить, что использование корней шлемника байкальского наиболее эффективно при заготовке сырья после вегетации (позже 15 октября).

Важной вехой в жизни Петра Григорьевича и его коллег стало создание в ДВФ СО АН СССР в 1964 г. Института биологически активных веществ, переименованного в 1972 г. в Тихоокеанский институт биоорганической химии (ТИБОХ). На Дальнем Востоке начались широкомасштабные исследования по изучению биологически активных веществ из наземных и морских организмов.

Петр Григорьевич, тогда уже известный ученый-ботаник, один из ведущих специалистов в области хемотаксономии растений, возглавил лабораторию растительного сырья, которая приступила к изучению связи таксономических признаков растений с их химическим составом. Впоследствии эти работы получили широкое признание научной общественности, в том числе в Китае, Южной Корее, Японии и США.

В институте с первых дней его создания развивалось еще одно научное направление – связанное с экспедиционными работами на территории Дальнего Востока. У истоков этого направления стояли ботаники из лаборатории Петра Григорьевича. 21 мая 1964 г. состоялся первый выезд сотрудников лаборатории на полевые работы в Партизанский и Шкотовский районы. За годы работы в ТИБОХ П.Г. Горовой исследовал практически весь Дальний Восток. Он возглавлял экспедиции в Приморский край, Амурскую, Сахалинскую, Магаданскую, Камчатскую области, на Командорские, Карагинский и Курильские острова и во многие другие места. Далеким и труднодоступным уголкам Дальнего Востока – островам, вершинам, хребтам – исхожены и обследованы Петром Григорьевичем вдоль и поперек. Ничего не ускользает от его цепкого профессионального взгляда. П.Г. Горовой описал более 30 новых для науки видов и надвидовых таксонов и выявил более 50 новых для России и Дальнего Востока родов и видов растений. Им опубликован цикл работ, посвященный новым видам дальневосточной флоры и флористическим исследованиям высокогорий и островов Дальнего Востока.

Условия в экспедиционных поездках зачастую весьма суровы, но Петр Григорьевич всегда заботился о своих коллегах. Сотрудники лаборатории Горового вспоминают, что участие в экспедиции Петра Григорьевича, опытного таежника, прекрасного охотника и удачливого рыбака, – это гарантия того, что к столу будет свежая уха или дичь. С ним комфортно, весело, он надежный.

П.Г. Горовой был организатором пяти международных экспедиций в США. Из каждой такой экспедиции он привозил гербарные образцы, сырье для химических анализов. Гербарий, собранный П.Г. Горовым и сотрудниками лаборатории на российском Дальнем Востоке, в Сибири и зарубежных странах (Японии, Республике Корея, Китае, США), насчитывает сегодня более 120 тысяч экземпляров.

Интересы и увлечения Петра Григорьевича широки и многогранны. Природа не только кормит, но и врачует – это он усвоил с детства, когда еще совсем юным ходил в лес на охоту и примечал растения, способные лечить. Совместно с коллегами, при активном участии выдающегося ученого Олега Борисовича Максимова П.Г. Горовой осуществил скрининг более 600 восточноазиатских видов высших растений на наличие в них антиоксидантов, что позволило выявить таксоны, перспективные для использования в пищевой промышленности, медицине и биотехнологии. В результате многолетней и кропотливой работы

на основе дальневосточного растения семейства бобовых *Maackia amurensis*, обладающего гепатопротекторными свойствами, был создан уникальный гепатозащитный препарат «Максар». П.Г. Горовой – один из разработчиков этого препарата.

Кроме «Максара» Горовой разработал и внедрил в пищевую промышленность «Уссурийский бальзам», в состав которого входит более 30 дальневосточных растений, в том числе золотой корень (*Rhodiola rosea*), женьшень (*Panax ginseng*), элеутерококк (*Eleuterococcus senticosus*). Им были созданы и другие бальзамы.

Петр Григорьевич обладает не только интуицией, которая, скорее всего, есть результат накопленных знаний и наблюдений, но еще и способностью продумывать проблему «от» и «до», четко выбирая цель. Сегодня мы понимаем, как он был прав, отстаивая необходимость изучения в институте растений, в то время как приоритетной многие считали морскую тематику.

Вся жизнь Петра Григорьевича связана с ботаникой, изучением проблем систематики и хемотаксономии высших растений Восточной Азии. В сферу его научных интересов входит также ресурсосведение, ботаническая библиография и история ботаники. Он неутомимый труженик, даже в выходные и во время отпуска, с весны и до глубокой осени сам собирает образцы растений, делает заготовки для химических исследований. Академик Горовой работал в крупнейших гербариях Европы, Азии и Америки.

Более 55 лет Петр Григорьевич возглавляет лабораторию хемотаксономии в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН. Задача лаборатории – исследование систематики и изучение возможностей использования в фармацевтической промышленности дальневосточных растений семейств зонтичных, лилейных, сложноцветных, колокольчиковых, барбарисовых, лютиковых, березовых, губоцветных, аралиевых, бурачниковых, орхидных, бобовых, розоцветных, гречишных.

Петр Григорьевич является автором и соавтором 20 патентов, 500 статей и 12 монографий, в том числе библиографического обзора «Флора, растительность и растительные ресурсы Дальнего Востока» (1973 г.), которая содержит информацию о 7510 литературных источниках, опубликованных с 1928 по 1969 г.

С 1995 по 2002 г. П.Г. Горовой был главным ученым секретарем ДВО РАН, совмещая административную деятельность с активными научными исследованиями.

На протяжении многих лет Петр Григорьевич ведет активную работу по подготовке научных кадров. Зачастую он суров, требователен и строг к своим подопечным, но в трудную минуту всегда подставит плечо. Пройдя через «жернова» его науки, становясь сильным и целеустремленным, появляется уверенность в своих силах. Под его руководством защищены 21 кандидатская и 5 докторских диссертаций. Среди учеников Петра Григорьевича есть уже члены академии РАН, избранные за выдающиеся научные заслуги.

Много сил и времени Петр Григорьевич отдавал организованному в 90-е годы диссертационному совету по специальности «Биологические ресурсы». В совете защищали кандидатские и докторские диссертации специалисты, работающие на Дальнем Востоке, в Сибири и центральных регионах России. В Дальневосточном федеральном университете он читает курсы лекций «Флора Дальнего Востока», «Методы систематики растений», «Ботаническое ресурсосведение».

П.Г. Горовой, один из создателей Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН, в 1991 г. был избран членом-корреспондентом, а в 1997 г. – академиком РАН (по отделению биологических наук, специальность «Ботаника»). Он является членом редколлегий многих зарубежных и отечественных научных журналов: «Растительные ресурсы», «Экология», «Turczaninowia», «Сибирский экологический журнал», «Botanica Pacifica», «Тихоокеанский медицинский журнал». Награжден Орденом Почета и двумя медалями.

*НОВОЖИЛОВА Елена Владимировна,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
(Тихоокеанский институт биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток).
E-mail: n.e.v.a.0@yandex.ru*

*Подписка на журнал «Вестник Дальневосточного отделения РАН»
принимается всеми отделениями «Роспечати» с любого номера.
Индекс 70193.*

*Полнотекстовые варианты статей можно найти в Интернете:
<http://elibrary.ru/issues.asp?id=2774>*

Ответственный за номер В.А. Стоник
Номер подготовили к печати В.С. Жердев,
С.А. Машкин, Л.А. Русова, В.Е. Старовойтова, Т.А. Третьякова
Компьютерный набор Г.А. Веренцовой
Компьютерная верстка И.В. Миромановой
Корректор Л.И. Горбулина
Переводчик П.Э. Кирпичёв

Адрес редакции:
690091 Владивосток,
ул. Светланская, 50, к. 51,
тел. (423)222-25-88
E-mail: vestnikdvo@hq.febras.ru
<http://www.vestnikdvo.ru>

Издатели:
ФГБУ Дальневосточное отделение РАН
690091 Владивосток, ул. Светланская, 50.
Тел. +7(423)222-25-28
ФГБУНО Центральная научная библиотека ДВО РАН
Тел. +7(423)231-78-38
690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159.

Выход в свет 30.10.2019 г.
Формат 70 × 108/16
Печать офсетная
Усл. печ. л. 14,00
Уч.-изд. л. 13,4
Тираж 300 экз. Заказ ИВ 191025
Цена свободная

ФГУП «Издательство Дальнаука»
Тел. +7(423)231-21-05
690041 Владивосток, ул. Радио, 7

Отпечатано в ООО «ПОЛИГРАФ–СЕРВИС–ПЛЮС»
690078 Владивосток, ул. Русская, 65, корпус 10

Свидетельство Роскомнадзора о регистрации ПИ № ФС77-75560 от 12.04.2019 г.