



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

XX ВСЕРОССИЙСКАЯ МОЛОДЁЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО АКТУАЛЬНЫМ ПРОБЛЕМАМ ХИМИИ И БИОЛОГИИ

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ



4-8 сентября 2023 г.
Владивосток

УДК 577
ББК 28.07

XX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, ТИБОХ ДВО РАН. Материалы конференции / Владивосток, 4-8 сентября 2023. – Владивосток.

В сборнике представлены тезисы пленарных докладов ведущих ученых, а также устных и стендовых докладов студентов, аспирантов и молодых специалистов, участников XX Всероссийской молодежной школы-конференции. В рефератах отражены результаты научных работ по приоритетным направлениям химии, биологии, прикладной биологии и медицины. Для студентов, аспирантов, научных сотрудников и специалистов в области химии и биологии.

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

Мероприятие проведено при финансовой поддержке ООО «Компания Хеликон», промышленно-торговой фирмы «Корпус» и ООО «Биоген-Аналитика», г. Владивосток.

DOI: 10.47471/20_2023_09_04_08_0
ISBN 978-5-91849-169-0



ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ

Председатель:

Стоник Валентин Аронович, академик, профессор, научный руководитель ТИБОХ ДВО РАН.

Члены программного комитета:

Дмитренко Павел Сергеевич, д.х.н., директор ТИБОХ ДВО РАН.

Деев Сергей Михайлович, академик, профессор, г.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

Иванов Алексей Сергеевич, д.б.н., профессор, зав. лабораторией межмолекулярных взаимодействий ИБМХ.

Гилеп Андрей Александрович, к.б.н., ИБМХ, в.н.с., глава Департамента молекулярной биотехнологии ИБХ НАН, г. Минск, Беларусь.

Аминин Дмитрий Львович, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией биоиспытаний и механизмов действия БАВ ТИБОХ ДВО РАН.

Черников Олег Викторович, к.б.н., зам. директора ТИБОХ ДВО РАН.

Давыдова Виктория Николаевна, к.х.н., зав. лабораторией молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Иванчина Наталья Владимировна, к.х.н., зав. лабораторией химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ КОНФЕРЕНЦИИ

Председатель:

Дмитренко Павел Сергеевич, д.х.н., директор ТИБОХ ДВО РАН.

Члены организационного комитета:

Кветкина Александра Николаевна, к.х.н., н.с. лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины ТИБОХ ДВО РАН.

Фильштейн Алина Петровна, к.х.н., м.н.с. лаборатории неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Володько Александра Викторовна, к.х.н., н.с. лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Гладких Ирина Николаевна, к.х.н., с.н.с. лаборатории молекулярной фармакологии и биомедицины ТИБОХ ДВО РАН.

Кокоулин Максим Сергеевич, к.х.н., с.н.с. лаборатории неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Суриц Валерий Викторович, м.н.с. лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН.

Борисова Ксения Леонидовна, к.х.н., ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН.

Сабуцкий Юрий Евгеньевич, к.х.н., с.н.с. лаборатории органического синтеза ТИБОХ ДВО РАН.

СОДЕРЖАНИЕ

Пленарные доклады	10
Стоник В.А. Лекарственные и другие биопрепараты на основе морских природных соединений	11
Демидов О.Н. Опухолевые клетки и их соседи: перспективы таргетной модуляции опухолевого окружения	12
Деев С.М. Новые подходы в диагностике и терапии рака	13-14
Андреев Я.А. Яды морских анемонов – древние пептиды для создания новых лекарств	15
Друцкая М.С. Функциональные и фенотипические особенности макрофагов в гомеостазе и при воспалении	16
Байков И.К., Курченко О.М., Михайлова Е.Е., Морозова В.В., Тикунова Н.В. Создание синтетических бактериофагов: подходы и успехи	17
Прасолов В.С. Ретровирусы: враги или друзья?	18-19
Дмитренко П.С. Современные методы масс-спектрометрии в исследованиях структур природных соединений	20
Гилеп А.А. Установление структуры и функций орфанных мембранных белков	21
Иванов А.С. Два подхода в экспериментальной белковой интерактоме	22
Кашеверов И.Е., Сон Л.В., Кудрявцев Д.С. Никотиновые холинорецепторы как мишень для вирусов	23
Стеценко Д.А., Буракова Е.А., Бизяев С.Н., Клабенкова К.В., Держалова А.Ш., Чжисхуэй Г., Патрушев Д.Э., Фокина А.А. Антибактериальные олигонуклеотиды	24-25
Скорик Ю.А., Дубашинская Н.В. Биополимерные системы доставки лекарственных средств	26
Устные доклады	27
Рузанова В.С. Объединение в один терапевтический режим двух современных технологий лечения злокачественных новообразований	28
Калужский Л.А., Цыбрук Т.В., Яблоков Е.О., Гнеденко О.В., Зелепуга Е.А., Кича А.А., Козловская Э.П., Иванчина Н.В., Гилеп А.А., Иванов А.С. Использование SPR биосенсора для поиска прототипов лекарственных средств	29
Устинова У.С., Адонина С.Н., Скотникова А.К., Базовкина Д.В. Влияние длительной социальной изоляции на поведение и серотониновую систему мозга у мышей с нокаутом гена фактора некроза опухоли	30
Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Иванов А.С. Изучение термодинамики межмолекулярных взаимодействий с помощью SPR-биосенсора	31
Ошихмина С.Г., Долгова Е.В., Ефремов Я.Р., Богачев С.С. Анализ экспрессии генов, характеризующих клетки В-лимфомы, захватывающие дцДНК, как опухолевые стволовые клетки	32
Тумилович А.М., Цыбрук Т.В., Яблоков Е.О., Басина В.П., Гнеденко О.В., Мезенцев Ю.В., Иванов А.С., Гилеп А.А.	33

Молекулярное клонирование, получение и характеристика эстрогенсульфотрансферазы (SULT1E1) и гидроксистероидсульфотрансферазы (SULT2A1) человека	
Жильникова М.В., Троицкая О.С., Коваль О.А. Первичная культура клеток увеальной меланомы для оценки роли VEGF-A в качестве маркера повышенного риска метастазирования и потенциальной мишени для противоопухолевой терапии	34
Варакса Т.С., Грабовец И.П., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А. Белок-белковые и белок-лигандные взаимодействия стероид-гидроксилаз <i>M. tuberculosis</i>	35
Иванова Н.О., Сердюк Я.В., Дианов Д.В., Фефелова Е.И., Боголюбова А.В. Разработка CAR-T-клеточного препарата для терапии злокачественных новообразований крови	36
Комарова А.А. Исследование действия амисульприда на серотониновые 5-HT7 рецепторы и нейротрофическую систему мозга в модели сверхэкспрессии тау-белка с мутацией [R406W] у мышей	37
Адолина С.Н., Скотникова А.К., Куликова Е.А., Базовкина Д.В. Влияние нокаута гена Tnf на серотониновую систему мозга при длительном и однократном введении бактериального липополисахарида	38
Одаренко К.В., Саломатина О.В., Салахутдинов Н.Ф., Зенкова М.А., Марков А.В. Амидные производные солоксолонна как новые ингибиторы высоко агрессивного фенотипа мультиформной глиобластомы	39
Дивейкина А.А., Исмангулова Д.Ю., Филимонов А.С., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. Разработка методов получения простых эфиров диффрактаевой кислоты	40
Риттер Г.С. РНК зависимая репарация ДЦР, как механизм действия нового радиопротекторного препарата	41
Филимонов А.С., Лузина О.А., Маренина М.К., Мешкова Ю.В., Яровая О.И., Хвостов М.В. Гидразонотиазолы на основе усниновой кислоты в качестве потенциальных ингибиторов основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2	42
Клабенкова К.В., Захрямина А.Е., Буракова Е.А., Бизяев С.Н., Стеценко Д.А. Новые полифторированные производные олигонуклеотидов по реакции Штаудингера	43
Яковчук Е.В., Шустова Е.Ю., Козловская Л.И. Молекулярно-генетическая характеристика популяции энтеровируса Коксаки А24, циркулирующей на территории РФ	44
Казакова А.В., Ищук С.А. Применение подхода дизайн эксперимента (DOE) для стандартизации технологии выделения и очистки экстракционного органопрепарата	45
Карнова Е.В., Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Байкова О.Ю., Мустафина А.Н.-И., Козловская Л.И. Применение генно-модифицированных штаммов S19 для оценки иммунитета к полиовирусам у детей, привитых различными вакцинами против полиомиелита	46
Кудрявцев Д.С. Природные соединения из морских организмов в исследовании никотиновых ацетилхолиновых рецепторов	47
Колпакова Е.С., Шустова Е.Ю., Камзеева П.Н., Аралов А.В., Козловская Л.И.	48

Оценка противовирусной активности производных бенгальского розового	
Калина Р.С., Гладких И.Н., Климович А.А., Кожевникова Ю.В., Кветкина А.Н., Рогожин Е.А., Кошелев С.Г., Дмитренко П.С., Козлов С.А., Лейченко Е.В. Противовоспалительный пептид морской анемоны <i>Stomphia coccinea</i>	49
Попкова Д.В., Синцова О.В., Климович А.А., Гладких И.Н., Кусайкин М.И., Бороздина Н.А., Шайхудинова Э.Р., Дьяченко И.А., Лейченко Е.В. Получение ингибитора α -амилаз, магнIFIкамида, из морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i> и изучение его свойств	50
Лещенко Е.В., Боркунов Г.В., Шлык Н.П., Худякова Ю.В., Попов Р.С. Использование подхода OSMAC с целью поиска новых вторичных метаболитов морских микроскопических грибов	51
Павленко А.П., Кветкина А.Н., Лейченко Е.В. Актинопорины как основа противоопухолевых препаратов	52
Иванова И.А., Еришова М.О., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Арчаков А.И. Позиционирование на единичной биомолекуле с целью исследования ферментативной активности методом атомно-силовой микроскопии	53
Меньшов А.С., Парамонов А.С., Шенкарев З.О., Попкова Д.В., Синцова О.В., Гладких И.Н., Лейченко Е.В. Пространственная структура и динамика ингибитора амилаз из морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i>	54
Еришова М.О., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О. Обработка данных АСМ-визуализации с помощью стандартных и специально разработанных программных обеспечений	55
Панина И.С., Чугунов А.О., Ефремов Р.Г., Гладких И.Н., Лейченко Е.В. Взаимодействие α -амилазы с магнIFIкамидом: изучение <i>in silico</i>	56
Потылицына А.Р., Бауман Ю.И., Шубин Ю.В., Попов А.А., Руднева Ю.В., Ведягин А.А., Мишаков И.В. Влияние добавки М в Ni-M катализаторах на морфологию и структуру углеродных нановолокон, полученных пиролизом трихлорэтилена	57
Александрова Ю.И., Назмутдинова В.А., Шурник Д.Н., Зеленихин П.В., Стойков И.И. Антибактериальные полимерные пленки на основе пиллар[5]арена и Моксифлоксацина гидрохлорида	58
Юхтанов Д.А., Науменко Л.Г., Мензоров А.Г., Дорошков А.В., Сульдина Л.А., Киселева Е.В., Морозова К.Н. Электронно-микроскопический портрет одноклеточного эукариота <i>Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii</i>	59
Лукьянов Д.А., Никандрова А.А., Имамутдинова А.Н., Волынкина И.А., Кряквин М.А., Остерман И.А., Донцова О.А., Сергеев П.В. Поиск новых антибиотиков и изучение их механизмов действия	60
Тарбеева Д.В., Федорев С.А., Крылова Н.В., Иунихина О.В., Бердышев Д.В. Биологически активные полифенолы маакии амурской	61
Цыбрук Т.В., Калужский Л.А., Барановский А.В., Иванчина Н.В., Кича А.А., Иванов А.С., Гилеп А.А. Взаимодействие СYP51 человека и азол-резистентных штаммов грибов рода <i>Candida</i> с природными и синтетическими стероидами	62
Скотникова А.К., Адонина С.Н., Москалюк В.С., Куликова Е.А., Базовкина Д.В. Влияние нокаута гена Tnf на поведение, экспрессию BDNF и серотониновую систему мозга при хроническом введении дексаметазона	63
Марьясина С.С., Айсин К.Н., Сергеев П.В., Польшаков В.И. ЯМР-метабомика в биомедицинских исследованиях	64

Спирин П.В. Современные и перспективные подходы к ингибированию вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1	65
Карпуть Е.Ю., Капустина И.И., Табакмахер К.Н., Макарьева Т.Н., Кича А.А., Иванчина Н.В., Дмитренко П.С., Калужский Л.А., Гилеп А.А. Лиганд-связывающие характеристики СУР51В1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> в отношении производных стероидов из морских организмов	66
Чиглинцева Д.А., Патутина О.А., Хейман Т., Сенькова А.В., Гапонова С.К., Власов В.В., Биченкова Е.В., Зенкова М.А. Крабоподобные искусственные рибонуклеазы для селективного ингибирования онкогенных миРНК	67
Бирюков М.М., Полякова А.А., Крячкова Н.В., Горбунова Е.А., Милахина Е.В., Закревский Д.Э., Швейгерт И.В., Коваль О.А. Перспективы совместного применения холодной плазмы и наночастиц золота в противоопухолевой терапии	68
Михайлова Е.Е., Байков И.К., Тикунова Н.В. Направленная эволюция антитела против вируса клещевого энцефалита для переключения его специфичности	69
Кашиник А.С., Баранов Д.С., Дзюба С.А. Взаимодействие ибупрофена с липидной мембраной и наноструктура его пространственного распределения в ней	70
Королёва П.И., Шумянцева В.В. Электрокаталитические цитохром Р450-системы: биосенсоры и биореакторы	71
Щербакова А.И., Цыбко А.С., Хоцкин Н.В., Науменко В.С. Изучение вклада BDNF в ассоциативное обучение мышей с аутистически-подобным поведением	72
Кисаретова П.Э., Найданова М.А., Салман Р., Бондарь Н.П. Хронический стресс изменяет чувствительность к глюкокортикоидам: вовлечение генов синтеза кортикостерона и ферментов энергетического метаболизма	73
Комлева П.Д., Изъюров А.Е., Арефьева А.Б., Хоцкина А.С., Хоцкин Н.В., Куликов А.В. Полиморфизм С1473G в гене <i>Trh2</i> модифицирует реакцию мышей на острое введение ЛПС	74
Евсюкова В.С., Сорокин И.Е., Арефьева А.Б., Куликова Е.А., Базовкина Д.В., Куликов А.В. Возрастные изменения в серотониновой системе и серотонин-зависимом поведении у рыб видов <i>Nothobranchius furzeri</i> и <i>Danio rerio</i>	75
Москалюк В.С., Кожемякина Р.В., Науменко В.С., Куликова Е.А. Влияние бензопентатиепина ТС-2153 на ключевые ферменты серотониновой системы триптофангидроксилазу 2 и моноаминоксидазу А в мозге ручных и агрессивных крыс	76
Закирова А.Е., Попов Р.С., Маханьков В.В., Ануфриев В.Ф. Метаболический профиль эхинохрома, субстанции лекарственного препарата гистохром. Новые данные	77
Володько А.В., Ермак И.М. Сравнение реологических свойств нагруженных эхинохромом плёнок на основе каррагинанов различных структурных типов	78
Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Черников О.В. Биологическая активность лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска <i>Glycymeris yessoensis</i>	79
Стеновые доклады	80

Веселова В.О., Филиппова А.Д., Гайтко О.М. Ферментоподобная активность зольей GeO ₂	81
Кравчук Б.И., Хлусевич Я.А., Матвеев А.Л., Чичерина Г., Краснова Е.И., Филимонова Е.С., Тикунова Н.В. Получение белка NS1 для дифференциальной диагностики ОГЛ	82
Федорец В.А., Тикунов А.Ю., Шрайнер Е.В., Чечушков А.В., Морозов В.В., Тикунова Н.В. Влияние фекотрансплантации и введения стерильного копрофилтратата на микробиом пациентов с язвенным колитом	83
Довгань В.В., Колесникова Т.Д., Похолкова Г.В., Шуберт Ф. Сайты наиболее эффективной ранней инициации репликации лежат в локусах генов экдизонового каскада у <i>Drosophila melanogaster</i>	84
Рубцов Н.К., Сильченко А.С., Ермакова С.П. Фукоидан-деградирующие ферменты 141 структурного семейства гликозидгидролаз морской бактерии <i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127 ^T	85
Козловский С.А., Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Чингизова Е.А., Калужский Л.А., Иванов А.С., Лихацкая Г.Н., Агафонова И.Г., Сабуцкий Ю.Е., Полоник С.Г., Манжуло И.В., Аминин Д.Л. Синтетическое производное 1,4-нафтохинона U-556 обладает противоболевой и противовоспалительной активностью на моделях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	86
Буракова Е.А., Бизяев С.Н., Чжихуэй Г., Держалова А.Ш., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые цвиттер-ионные олигонуклеотиды по реакции Штаудингера	87
Панина Е.А., Бабкин И.В., Волковинская А.И., Тикунова Н.В. Исследование DGR-кассеты бактериофага LMMB	88
Шкрабов Р.А., Усольцева Р.В., Шевченко Н.М., Кусайкин М.И., Расин А.Б., Ермакова С.П. Фукоиданы бурых водорослей семейства Laminariaceae и наночастицы на их основе	89
Голосова Н.Н., Матвеев А.Л., Козлова Ю.Н., Тикунов А.Ю., Морозова В.В., Тикунова Н.В. Эндолизины стафилококковых бактериофагов: конструирование и изучение их свойств	90
Суриц В.В., Усольцева Р.В., Зуева А.О., Шевченко Н.М., Ермакова С.П. Структурные характеристики и противоопухолевая активность <i>in vitro</i> полисахаридов бурой водоросли <i>Alaria ochotensis</i>	91
Щигал О.Е., Анисенко А.Н., Зиганшин Р.Х., Готтих М.Б. Идентификация клеточных белков-участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1	92
Пигуль Е.С., Романенко Л.А., Кокоулин М.С. Структурная характеристика капсульного полисахарида морской бактерии <i>Cobetia</i> sp. КММ 1376 ^T	93
Ковач С.М., Баланева Н.Н., Борисова К.Л., Сабуцкий Ю.Е., Пелазеев Д.Н. Синтез тиазол-углеводных конъюгатов на основе тиакарпина, аналога цитотоксического алкалоида из асцидии <i>Polysarpa aurata</i>	94
Сульдина Л.А., Морозова К.Н., Малахова А.А., Лагарькова М.А., Киселева Е.В. Ультроструктурная организация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с увеличенным числом САG повторов в гене хантингтина, использующихся для создания клеточных моделей болезни Хантингтона	95
Лукьянова А.А., Асеведо-Солис П.А., Комаревцев С.К., Евсеев П.В., Мирошников К.А.	96

Исследование гидролаз бактериофагов, инфицирующих патогены сои рода <i>Curtobacterium</i>	
Стринкевич А.А., Королев С.П., Галкин С.О., Анисенко А.Н., Хандажинская А.Л., Готтих М.Б. Создание полноразмерного репликона коронавируса SARS-CoV-2 для безопасного тестирования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса	97
Клименко А.М. Хлорины тихоокеанских офиур <i>Ophiura sarsii</i> и <i>Ophiura ooplax</i> проявляют высокую фототоксичность в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы человека	98
Яроцкая В.В., Шубина Л.К., Гузий А.Г., Макарьева Т.Н. Монанхамид А из морской губки <i>Monanchora pulchra</i>	99
Толканов Д.К., Калиновский А.И., Попов Р.С., Кича А.А. Исследование полярных стероидных метаболитов из дальневосточных морских звезд <i>Henricia</i> sp.	100
Кожевникова Ю.В., Климович А.А., Калина Р.С., Гладких И.Н., Лейченко Е.В. Анксиолитическое, анальгезирующее и противовоспалительное действие модуляторов кислоточувствительных ионных каналов из морской анемоны <i>Heteractis magnifica</i>	101
Авторский указатель	102

Пленарные доклады

Лекарственные и другие биопрепараты на основе морских природных соединений

Стоник В.А.*

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
*stonik@piboc.dvo.ru

Участники крупного научного проекта по изучению Мирового океана «Перепись морской жизни» недавно опубликовали данные подсчета числа видов живых организмов на Земле. Показано, что научные описания даны для 228450 видов морских организмов из 2,2 млн существующих по прогнозным оценкам в морях и океанах. Хотя большинство морских организмов еще не открыты, из них уже выделили более 30000 различных природных соединений, изучение которых внесло большой вклад в разработку новых лекарств. Так, в 1951 г. Джузеппе Бротцу и сотрудники (Италия) в пробе сточных вод, собранных у берегов о-ва Сардиния, обнаружили аскомицет *Cephalosporium acremonium* - продуцент цефалоспоринового антибиотика, ингибирующий устойчивые к пенициллинам болезнетворные бактерии. Сейчас разработаны десятки антибиотиков этого ряда, принадлежащие к пяти поколениям широко применяемых лекарств. В том же году Вернер Брегман (Йельский ун-т, США) выделил из губки *Cryptotethya crypta* 2 необычных нуклеозида, названных им спонготимидином и спонгоуридином. На основе их изучения были созданы первые нуклеозидные лекарства – противоопухолевый препарат «Арабиноцитозин» и противовирусный «Арабиноаденин». В наше время нуклеозидные лекарства стали одной из самых больших групп медицинских препаратов. К ним относятся «Ацикловир», «Азидотимидин» и десятки других широко применяемых лекарств.

Два препарата серии «Гистохром» на основе пигмента морских ежей эхинохрома А были созданы в нашем Институте: один для применения в офтальмологии, другой – в кардиологии (О.Б. Максимов и другие). Первый применяют для лечения заболеваний глаз при внутренних кровоизлияниях, второй – при лечении инфаркта миокарда для уменьшения зоны некроза сердечной мышцы. Препараты разрешены к применению Фармкомитетом России в 1998 г. На основе отходов переработки Камчатского краба в ТИБОХ ДВО РАН была разработана схема получения противоожогового и ранозаживляющего ферментного медицинского препарата «Коллагеназа КК», получена его опытно-промышленная партия, выполнены доклинические и клинические исследования. Препарат был разрешен к применению и производству Фармкомитетом России в 2001 г. (Э.П. Козловская и др.).

Новое поколение противоопухолевых препаратов на основе морских алкалоидов «Йонделис» (Трабектедин), «Залиписис» и др. было создано в результате работ американского химика Кеннета Райнхарта и испанской фармацевтической компании «Фармамар». Препараты – производные полициклических полиэфирных соединений – «Халавен» и другие - были разработаны американскими и японскими учеными. Они действуют на опухолевые клетки как митотические яды, нарушая функционирование трубочек микроскелета подобно паклитакселу (таксолу), но сильнее последнего. На основе открытия очень мощных цитотоксических пептидов доластатинов, найденных Джорджем Пети из Ун-та Аризоны (США) в следовых количествах в некоторых моллюсках, был разработан один из первых таргетных противораковых препаратов «Адцетрис» («брентуксимаб»).

В докладе обсуждаются также истории создания и результаты, полученные при изучении других «морских» лекарств, например, анальгетика «Приалта» (зиконотида) из моллюсков, «MorDNA» из рыбьего жира, «Плтидепсина» из асцидий, а также примеры препаратов, находящихся на различных стадиях изучения (например, GTS-21 на основе алкалоида морских червей для лечения шизофрении, иммуностимулятора «Кумазид» на основе гликозидов голотурий, «Бриостина-1» из мшанки, ослабляющего симптомы болезни Альцгеймера, и др.).

Опухолевые клетки и их соседи: перспективы таргетной модуляции опухолевого окружения

Демидов О.Н.^{1,2,*}

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

²НГУ Сириус, Сочи

*Oleg.demidov@u-bourgogne.fr

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов возникновения онкологических заболеваний, они остаются одной из главных причин смертности. Долгие годы тестирование противоопухолевых препаратов было в основном нацелено на достижение максимального цитотоксического эффекта на опухолевых клетках в условиях их монокультуривирования *in vitro* и поисках оптимального «терапевтического окна» в экспериментах *in vivo*. Осознание факта, что опухоль неоднородна и опухолевые клетки подчас составляют меньшинство в общей её массе, привлекло внимание к микроокружению опухоли. Оказалось, что различные типы клеток опухолевого окружения (клетки стромы, гемопоэтические клетки и ряд других) отличаются по своим характеристикам от подобных клеток, встречающихся в нормальных органах и тканях, и могут влиять непосредственно на свойства опухолевых клеток: способствовать малигнизации, приобретению устойчивости к проводимой терапии и к противоопухолевому иммунному ответу.

В нашей работе мы используем культуры первичных клеток, фибробластов и миелоидных клеток, ассоциированных с опухолью. Изучаем, как взаимодействие со злокачественными клетками меняет свойства «здоровых» клеток микроокружения, делая их своими союзниками, способствующими дальнейшему прогрессированию онкологического заболевания. *In vitro* и *in vivo* моделирование сложных взаимосвязей внутри опухоли позволяет нам лучше разобраться в механизмах онкогенеза, в развитии лекарственной резистентности и других особенностях злокачественной патологии, что помогает в разработке новых стратегий повышения эффективности противоопухолевого иммунного ответа и/или преодоления устойчивости опухолевых клеток к проводимой терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-20128.

Новые подходы в диагностике и терапии рака

Деев С.М.*

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

*biomem@mail.ru

Новые подходы для персонализированного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями включают разработку инновационных многофункциональных структур, сочетающих в себе высокоселективные элементы для распознавания опухолевых клеток и объединение их с препаратами для высокоточной диагностики и эффективного лечения рака. Таргетная доставка агентов к опухоли обладает огромной перспективой для этих целей. Развитие технологий каркасных белков-скаффолдов революционно упростило создание реагентов направленного действия. Будут комплексно рассмотрены ключевые аспекты создания таргетных многофункциональных структур и проведено сравнение различных вариантов направляющих молекул по их способности выявлять патогенные очаги в организме. Упомянуты новейшие направления онкотерапии, призванные существенно улучшить избирательность воздействия на опухоли, такие как соединение нацеливающих каркасных белков с альбумин-связывающим доменом и претаргетинг. Отдельное внимание будет уделено новому направлению – созданию адресных радионаноматериалов. Дан объективный анализ их преимуществ и недостатков, предложены решения, призванные снизить нежелательное воздействие на здоровые органы и ткани организма и улучшить доставку в патогенные очаги.

Ссылки:

1. Bragina, O., et al. Direct Intra-Patient Comparison of Scaffold Protein-Based Tracers, [^{99m}Tc]Tc-ADAPT6 and [^{99m}Tc]Tc-(HE)₃-G3, for Imaging of HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers*, **2023**, 15(12), 3149.
2. Kalinovsky, D. V., et al. Minibody-Based and scFv-Based Antibody Fragment-Drug Conjugates Selectively Eliminate GD2-Positive Tumor Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24(2), 1239.
3. Shipunova, V. O., et al. Targeted Two-Step Delivery of Oncotheranostic Nano-PLGA for HER2-Positive Tumor Imaging and Therapy *In Vivo*: Improved Effectiveness Compared to One-Step Strategy. *Pharmaceutics*, **2023**, 15(3), 833.
4. Xu, T., et al. Feasibility of Co-Targeting HER3 and EpCAM Using Seribantumab and DARPIn-Toxin Fusion in a Pancreatic Cancer Xenograft Model. *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 24(3), 2838.
5. Bragina O., et al. Phase I trial of ^{99m}Tc-(HE) 3-G3, a DARPIn-based probe for imaging of HER2 expression in breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, **2022**, 63(4), 528-535.
6. Kalinovsky D.V., et al. Therapeutic efficacy of antibody-drug conjugates targeting GD2-positive tumors. *J. Immunother. Cancer*, **2022**, 10(6).
7. Stepanov A.V., et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2022**. 119(46), e2210562119.
8. Abakumova T.O., et al. Barnase-Loaded Vaterite Nanoparticles Functionalized by EpCAM Targeting Vectors for the Treatment of Lung Diseases. *ACS Applied Nano Materials*, **2022**, 5(8), 10744-10754.
9. Tolmachev V.M., et al. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy. *Russian Chemical Reviews*, **2022**, 91(3), RCR5034.
10. Shramova E.I., et al. Genetically encoded BRET-activated photodynamic therapy for the treatment of deep-seated tumors. *Light: Science & Applications*, **2022**, 11(1), 1-13.
11. Zelepukin I.V., et al. Direct photoacoustic measurement of silicon nanoparticle degradation promoted by a polymer coating. *Chemical Engineering J.*, **2022**, 430, 132860.

12. Zelepukin I.V., et al. Flash drug release from nanoparticles accumulated in the targeted blood vessels facilitates the tumour treatment. *Nat Commun.* **2022**, *13*(1), 6910.

Яды морских анемонов - древние пептиды для создания новых лекарств

Андреев Я.А.^{1,2,*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

*aya@ibch.ru

Стрекающие это древнейшие ядовитые животные, у которых отсутствует централизованная система яда. Вместо ядовитых желез морские анемоны производят яд по всему телу, в специализированных клетках, таких как нематоциты и клетки эктодермальных желез. Нематоциты содержат внутри сложные заполненные ядом органеллы (книдоциты), которые являются основным средством доставки яда, они состоят из капсулы, содержащей полую стрекательную нить, способную к чрезвычайно быстрому и мощному выстрелу. Интересно, что большинство морских анемонов безвредны для человека. Большинство поражений, вызванных морскими анемонами представляют собой кожную сыпь и отек в области контакта с щупальцами. Однако яд некоторых видов может вызывать серьезные последствия, такие как острая боль, некроз, кардиотоксичность и нейротоксичность.

Характеристика токсинов из яда морских анемонов чаще всего делается направленным поиском терапевтически значимых соединений. Было показано, что яды морских анемонов представляют собой сложные смеси белков, пептидов и небелковых соединений. При этом, для большинства известных токсинов морских анемонов информация о рецепторах, на которые они нацелены (например, подтипы ионных каналов), либо неизвестны, либо в лучшем случае неполны. В результате состав большинства ядов актиний остается неизвестным, несмотря на десятилетия исследований.

Систематическое изучение яда морской анемоны *Metridium senile* выявило пептидные компоненты, модулирующие работу TRPA1 и ASIC1a каналов, а также никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Найденные пептиды были исследованы *in vitro* и *in vivo*. Было обнаружено разнонаправленное действие модуляторов TRPA1 и ASIC1a каналов в моделях боли на животных, что подчеркивает разнообразный потенциал активных компонентов ядов морских анемонов. Полученные пептиды яда *M. senile* могут быть полезными инструментами для изучения сигнальных путей боли, связанных с этими каналами.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-15-00322, <https://rscf.ru/project/21-15-00322/>.

Функциональные и фенотипические особенности макрофагов в гомеостазе и при воспалении

Друцкая М.С.*

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва
*marinadru@gmail.com

Важную роль в поддержании гомеостаза и регуляции воспаления играют макрофаги – клетки врожденной иммунной системы, характеризующиеся высокой функциональной пластичностью. В зависимости от фенотипа и происхождения они могут иметь как регуляторные свойства, так и способствовать развитию воспаления и усугублять течение заболевания. Один из подходов к изучению функций макрофагов основан на возможности кондиционной инактивации генов в этих и других миелоидных клетках *in vivo*. Так, изучение мышей с кондиционными нокаутами TNF и IL-6, основных медиаторов воспаления, позволило выявить вклад отдельных типов миелоидных клеток в иммунопатогенез, а также обосновать инновационные клинические стратегии, направленные на комбинированную блокировку этих цитокинов или на избирательное таргетирование макрофагов в нескольких экспериментальных моделях заболеваний. Кроме того, с применением комплексного анализа иммунометаболических изменений в макрофагах в ответ на воспаление было показано, что метаболическое репрограммирование тканерезидентных макрофагов также может быть рассмотрено как перспективная терапевтическая стратегия.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-75-30032.

Создание синтетических бактериофагов: подходы и успехи

Байков И.К.^{1,2,*}, Курченко О.М.^{1,2}, Михайлова Е.Е.^{1,2}, Морозова В.В.^{1,2}, Тикунова Н.В.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*ivan_baykov@mail.ru

Одним из направлений синтетической биологии является создание искусственных бактериофагов с модифицированными геномами. Такой подход существенно расширяет возможности «классической» фаготерапии. Например, изменение генов рецептор-связывающих белков позволяет перенаправлять фаги на другие бактерии. Благодаря этому возможно создание синтетических фагов, объединяющих литические свойства одного бактериофага и тропность другого фага. Другим примером является внесение в фаговый геном генов, токсичных для бактерии-хозяина. Это позволяет усилить литические свойства фагов, тем самым повышая терапевтический эффект от применения такого препарата. Наконец, редактирование генов природных фагов позволяет устанавливать функции белков, кодируемых этими генами. Учитывая высокую долю генов с неустановленной функцией в фаговых геномах, этот подход может дать ценную информацию об организации фагов.

Классические способы генетической инженерии (использование эндонуклеаз рестрикции в сочетании с ДНК-лигазой) малоэффективны для редактирования фаговых геномов. Поэтому в настоящее время разработаны три альтернативных подхода: сборка фаговых геномов из фрагментов в дрожжевых центромерных плазидах, сборка фаговых геномов методом Гибсона и встройка целевого гена в результате рекомбинации фаговой ДНК. В докладе кратко рассмотрены особенности каждого из этих подходов. Кроме того, рассмотрен процесс получения инфекционных частиц на основе фаговых геномов – так называемый процесс «перезапуска» фаговых геномов.

В заключительной части доклада представлены данные по конструированию двух синтетических фагов против патогенной бактерии *Klebsiella pneumoniae*. В ходе этого исследования для двух модельных подовирусных бактериофагов КР32_192 и КР32_195, узнающих разные штаммы *K. pneumoniae*, были зеркально переставлены гены, кодирующие белки хвостовых шипов. Как и ожидалось, специфичность полученных синтетических фагов изменилась в соответствии с последовательностями генов хвостовых шипов.

Ретровирусы: враги или друзья?

Прасолов В.С.*

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва

*prassolov45@mail.ru

Интерес к вирусам обусловлен прежде всего тем, что они являются возбудителями болезней животных, растений и микроорганизмов. И хотя с момента выделения первого вируса нашим соотечественником Д.И. Ивановским прошло более 100 лет, однако, к настоящему времени известно не более 3-5% существующих в природе вирусов.

Одними из первых вирусов млекопитающих и птиц были ретровирусы, которые вызывали развитие заболеваний кроветворной системы (лейкозы) и солидных злокачественных опухолей. Геном этих ретровирусов, заключенный в белковую капсиду, представлен двумя практически идентичными молекулами одноцепочечной + (позитивной) РНК.

Более 50 лет жизненный цикл простых и сложных ретровирусов оставался нераскрытым. Только в начале 70-ых годов было установлено, что ретровирусы обладают замечательным свойством: при заражении чувствительных клеток на одноцепочечной вирусной РНК осуществляется синтез провируса - полногеномной двуцепочечной ДНК, фланкированной длинными концевыми повторами (LTR). Этот процесс, получивший название обратной транскрипции, осуществляется вирус-специфическим ферментом – обратной транскриптазой. Обратная транскриптаза, наряду с ДНК синтезирующей активностью, обладает еще и активностью РНК-азы Н, то есть способностью гидролизовать РНК в составе двуцепочечных РНК-ДНК гибридов, что и реализуется обратной транскриптазой в ходе синтеза провируса.

Открытие обратной транскрипции не только обогатило фундаментальную молекулярную биологию, генетику и клеточную биологию, но и сыграло огромную роль в развитии прикладных областей биологии, в первую очередь, биомедицины и биотехнологии.

Исследование трансформирующих (онкогенных) ретровирусов показало, что их геном содержит один из регуляторных генов клеток хозяев, но при этом теряет последовательности вирусных генов. Вследствие этого трансформирующие вирусы не способны самостоятельно осуществлять продуктивный жизненный цикл и нуждаются в одновременном присутствии в зараженной клетке и полноценного репликационно-компетентного вируса - помощника, обеспечивающего как собственную репликацию, так и репликацию дефектного трансформирующего вируса.

Такой дефектный, репликативно-некомпетентный вирус, сформированный с использованием белков репликационно-компетентного вируса-помощника, способен заразить чувствительные клетки. Однако провирус дефектного ретровируса, интегрированный в геном этих клеток, самостоятельно не может обеспечить репликацию ретровируса, хотя и способен направлять экспрессию захваченных ранее клеточных генов.

Результаты исследований таких репликативно-некомпетентных трансформирующих вирусов позволили разработать в 80-ых годах эффективные системы ретровирусного переноса и экспрессии целевых и маркерных генов в клетках млекопитающих, в том числе и человека. Эти системы нашли широкое распространение и с успехом используются во многих исследовательских программах, в биотехнологии и биомедицине, в частности, в генной терапии.

В геноме ретровирусов можно выделить так называемые cis-элементы - последовательности, которые обязательно должны присутствовать в одноцепочечной вирусной РНК и, соответственно, в образованной на РНК двуцепочечной ДНК провируса. Эти последовательности необходимы для успешного осуществления обратной транскрипции, приводящей к образованию ДНК-провируса, содержащего на 5' и 3' концах длинные концевые повторы (LTR). Последовательности генома, кодирующие все ретровирусные белки (gag, pol и env), могут быть полностью или частично утеряны, или направлены

удалены, так как присутствие в зараженной клетке вируса-помощника обеспечивает образование вирусных частиц дефектного ретровируса. Они построены из белков, синтез которых направляется провирусом-помощником. Эти последовательности являются *trans*-элементами, белковые продукты которых могут быть предоставлены помощником.

Одна из первых в мире эффективных систем ретровирусного переноса и экспрессии генов была сконструирована П.М. Чумаковым и В.С. Прасоловым в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта АН СССР. С помощью этой и развитых на ее основе усовершенствованных систем были получены продуценты многих белков, востребованных фундаментальной наукой и биотехнологической практикой.

Существенной составляющей ретровирусов и сконструированных на их основе вирусных векторов является липидная оболочка, представляющая внешнюю мембрану зараженной клетки, в которой осуществлялась сборка вирусной частицы. Поэтому ретровирусы относят к так называемым оболочечным вирусам. (Наряду с ретровирусами, такой оболочкой обладают и некоторые вирусы иной природы). Эта липидная оболочка ретровирусных частиц содержит трансмембранные белки *env* ретровируса. Они обеспечивают продуктивное взаимодействие вируса с соответствующим рецепторным клеточным белком, локализованным на клеточной поверхности. Именно такое белок-белковое взаимодействие ответственно за специфический избирательный контакт ретровируса с клетками, несущими рецепторные белки. В конечном счете, это и определяет круг хозяев вируса, или тропизм вируса.

Ретровирусы, взаимодействующие с одним и тем же клеточным рецептором, образуют группу интерференции. Клетки, продуктивно зараженные одним ретровирусом, не могут быть вторично заражены этим же ретровирусом или другими ретровирусами той же группы интерференции, но могут быть заражены ретровирусами другой группы интерференции.

Особый интерес представляют так называемые эндогенные ретровирусы. К ним относятся вирусы, провирусы которых интегрировали не только в геном соматических клеток, но и в геном репродуктивных клеток. В этом случае провирус передается от поколения к поколению организмов-хозяев на протяжении длительного времени - до сотен и миллионов лет. Как правило, эндогенные ретровирусы находятся в латентном состоянии, однако, они могут быть активированы в результате различных воздействий.

Нам удалось впервые выделить эндогенные ретровирусы двух ранее неизвестных групп интерференции. Было установлено, что эти ретровирусы используют клеточные белки, рецепторные функции которых для ретровирусов были неизвестны. Один из них, эндогенный ретровирус M813 из клеток мышевидного грызуна *Mus cervicolor* из Юго-Восточной Азии, использует в качестве рецептора клеточный трансмембранный Na-зависимый транспортер мио-инозитола. Второй, эндогенный ретровирус McERV, выделенный из грызуна *Mus caroli*, использует в качестве рецептора трансмембранный клеточный белок плазмолипидин (PLLP).

Ретровирус M813 из *M. cervicolor* является строго экотропным, он способен эффективно заражать только клетки мышей, но не клетки человека и даже не клетки крыс. Этим же свойством обладают и сконструированные нами векторы, несущие белок оболочки данного вируса. Интересно, что вирус способен вызывать слияние клеток и формирование больших синцитиев, содержащих более 40 ядер. Векторы на основе ретровируса McERV способны адресно переносить цитотоксические гены в злокачественные клетки глио- и нейробластомы человека с высоким содержанием PLLP. Нами успешно использованы такие векторы для уничтожения злокачественных опухолевых клеток человека, трансплантированных иммунодефицитным мышам.

Современные методы масс-спектрометрии в исследованиях структур природных соединений

Дмитренко П.С.*

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

Современная масс-спектрометрия (МС) в настоящее время является самой мощной аналитической методологией в науках о жизни. Ее возможности и перспективы развития критически определяют уровень современных исследований в химии природных соединений, медицине, молекулярной биологии, фармацевтике и др. Развитие МС идет параллельно по двум главным направлениям (эти направления взаимозависимы с сильной обратной связью): 1. Развитие масс-спектрометрии как науки и метода; 2. Развитие приложений масс-спектрометрии.

Все более широкое применение масс-спектрометрии при установлении структур природных веществ связано, в первую очередь, с высокой селективностью и чувствительностью МС методов, а также быстротой анализа. МС анализ исследуемых веществ позволяет не только с высокой точностью устанавливать молекулярные формулы метаболитов, но также дает ценную информацию о структурных фрагментах исследуемых молекул и позволяет предположить их химические структуры.

Количество новых приложений метода МС огромно. Кроме структурного анализа низкомолекулярных метаболитов это и стремительное развитие методов метаболомики, липидомики, протеомики и других омикс-областей.

В ТИБОХ ДВО РАН широко применяются современные методы масс-спектрометрии для изучения широкого круга вторичных низкомолекулярных метаболитов и высокомолекулярных соединений, выделенных из морских и наземных источников. Масс-спектрометры — это универсальные приборы, которые можно использовать для качественного и количественного анализа огромного количества соединений, от простых газов до сложных биополимеров. Различные способы объединения компонентов прибора в системы позволяют применять сложные подходы к вводу и анализу проб. Существуют также обширные программные пакеты для обработки огромного количества генерируемых данных. Сила масс-спектрометрии заключается в ее необычайной универсальности, но цена этого разнообразия заключается в том, что масс-спектрометры часто являются сложными и дорогими приборами. На современном этапе развития МС можно говорить, что разнообразие методов ионизации молекул, методов разделения ионов, способов детектирования, обработки и представления результатов способно решить сложнейшие задачи структурного изучения морских и наземных природных соединений.

Установление структуры и функций орфанных мембранных белков

Гилеп А.А.^{1,2,*}, Иванов А.С.², Струшкевич Н.В.³

¹Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск

²ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

³Сколковский институт науки и технологий, Москва

*agilep@yahoo.com

Инновационная разработка эффективных терапевтических средств в абсолютном большинстве случаев состоит из следующей последовательности этапов: 1) идентификация мишеней (как правило, белков) для таргетной терапии; 2) структурно-функциональные исследования белковых мишеней и базирующегося на этом подборе молекул, потенциально способных необходимым образом модулировать функцию мишеней; 3) оптимизация фармакодинамических и фармакокинетических характеристик соединений-«лидеров» или оптимизация технологий клеточной иммунотерапии; 4) доклинические испытания отобранных кандидатов и технологий; 5) клинические испытания тех потенциальных лекарственных средств или технологий, которые показали наибольшую эффективность в доклинических испытаниях. При этом ключевыми в формировании инновационных продуктов и технологий являются 1-й и 2-й этапы. Следует отметить, что основными мишенями для лекарственных средств являются мембранные белки, которые выполняют в организме ключевые функции передачи клеточных сигналов и синтеза важнейших биорегуляторов. Так, например, 7 из 10 лекарств-блокбастеров фармацевтического рынка имеют своими мишенями мембранные белки. При этом более половины глобальных продаж всех лекарственных средств на рынке относятся к лекарственным средствам, нацеленным на мембранные белки, что составляет около 3.5 трлн. долл. США за 2011-2015 гг. согласно оценке агентства IQVIA. К сожалению, при значительном интересе к мембранным белкам структура большинства из них неизвестна. Более того, многие мембранные белки человека относятся к группе орфанных белков – белков с неустановленной функцией.

В ходе доклада будет представлена информация о современных подходах в установлении структуры и функций мембранных и мембран-ассоциированных белков методами биоорганической химии, клеточной биологии, биоинформатики, структурной биологии и молекулярной интерактомики. В качестве примеров будут рассмотрены белки человека и клинически значимых патогенных микроорганизмов. Также будут рассмотрены подходы в установлении модуляторов активности данных белков.

В докладе также будет представлена информация о целях, задачах и мероприятиях научно-технической программы Союзного Государства «Технологическая платформа идентификации новых молекулярных мишеней: мембранных белков и их комплексов» («Союз-Биомембраны»).

Два подхода в экспериментальной белковой интерактомике

Иванов А.С.*

ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ), Москва

*professor-ivanov@yandex.ru

В живых системах большинство белковых молекул функционирует в составе различных молекулярных комплексов, формирующихся за счет белок-белковых взаимодействий (ББВ). Поэтому в современной протеомике активно развивается направление исследований ББВ, названное белковой интерактомикой [1]. В области фундаментальных исследований информация о ББВ крайне необходима для функциональной аннотации белков, понимания принципов работы внутриклеточных молекулярных машин и их регуляции. В прикладном плане, белковая интерактомика решает задачи по поиску низкомолекулярных регуляторов ББВ и нахождения целевых ББВ, которые могут рассматриваться в качестве потенциальных молекулярных мишеней для создания лекарств нового поколения. Все экспериментальные методы белковой интерактомики можно разделить на две группы: (1) исследование ББВ отдельных целевых белков - «локальная» интерактомика; (2) исследование ББВ всей массы белков, формирующих белковый интерактом (субинтерактом) - «омикс-интерактомика». В качестве примера рассмотрим интерактомные методы, используемые в лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ. Для исследования ББВ отдельных целевых белков мы используем метод прямого молекулярного фишинга, основанный на комбинации аффинной и высоко-эффективной гель-хроматографии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и LC-MS/MS идентификации белков [2]. В качестве аффинного реагента используется сам целевой белок, иммобилизованный на сорбенте (вариант препаративного фишинга) или на SPR чипе (вариант аналитического фишинга). Ключевым звеном является использование SPR биосенсора для экспериментального моделирования фишинга, оптимизации его протоколов и анализа присутствия белков-партнеров во фракциях лизата (аналитический фишинг) [3].

Для «омикс-интерактомики» мы разработали метод анализа стабильных белковых комплексов путем гель-хроматографического фракционирования лизата биоматериала, LC-MS/MS идентификации белков во фракциях и биоинформатического анализа данных [4]. Данный подход позволяет выполнить интерактомную паспортизацию каждого белка по следующим пунктам: (1) факт участия белка в формировании стабильных комплексов; (2) доля белка в мономерном или олигомерном состоянии; (3) распределение белка между комплексами разного размера; (4) размер комплексов, в формировании которых участвует белок; (5) списки возможных белков-партнеров в каждом комплексе.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2) с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

Ссылки:

1. А.С. Иванов, В.Г. Згода, А.И. Арчаков Технологии белковой интерактомики. *Биоорганическая химия*, **2011**, 37, 8-21.
2. P. Ershov, Y. Mezentsev, O. Gnedenko, D. Mukha, A. Yantsevich, V. Britikov, L. Kaluzhskiy, E. Yablokov, A. Molnar, A. Ivanov, A. Lisitsa, A. Gilep, S. Usanov, A. Archakov Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: experimental simulation and SPR validation. *Proteomics*, **2012**, 12, 3295–3298.
3. Florinskaya A., Ershov P., Mezentsev Y., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Medvedev A., Ivanov A. SPR Biosensors in Direct Molecular Fishing: Implications for Protein Interactomics. *Sensors (Basel)*. **2018**;18, 1616.
4. Y. Mezentsev, P. Ershov, E. Yablokov, L. Kaluzhskiy, K. Kupriyanov, O. Gnedenko, A. Ivanov Protein Interactome Profiling of Stable Molecular Complexes in Biomaterial Lysate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 15697.

Никотиновые холинорецепторы как мишень для вирусов

Кашеверов И.Е.* , Сон Л.В., Кудрявцев Д.С.

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

*shak_ever@yahoo.com

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) одни из наиболее хорошо изученных ионных каналов, участвующих в целом ряде важнейших физиологических процессов, таких как проведение нервного импульса, мышечные сокращения, когнитивные процессы, воспалительные реакции, боль. Такое разнообразие функций обусловлено большим количеством различных подтипов этих рецепторов, образующихся за счет формирования активных пентамерных каналов из разного типа субъединиц (которых на данный момент выявлено 17), а также весьма широким распределением различных подтипов нАХР в разных клеточных системах и органах – мышцах, центральной и периферической нервной системах, иммунных и некоторых других клетках. Нарушение работы определенных подтипов нАХР связывают с целым рядом заболеваний и патологических состояний, среди которых можно упомянуть болезни Альцгеймера и Паркинсона, шизофрению, эпилепсию, миастению, некоторые виды онкозаболеваний, никотиновую зависимость, болевую чувствительность. Активный поиск лекарственных средств для лечения ассоциированных с нАХР заболеваний, а также изучение молекулярных механизмов функционирования разных подтипов этих рецепторов осуществляется последние 50 лет с применением природных или сконструированных на их основе синтетических холинергических лигандов самой разной химической природы, наиболее известными из которых являются нейротоксины ядов змей, пептидные токсины брюхоногих, алкалоиды различного происхождения. К сожалению, распространенные по всему организму нАХР оказались также и мишенями для целого ряда вирусов. Классическим примером здесь является вирус бешенства, гликопротеин оболочки которого узнает в качестве основной своей мишени никотиновые рецепторы мышц, а также может взаимодействовать и с нейрональными подтипами нАХР мозга. Эти исследования, начатые более 40 лет назад, к настоящему времени позволили полностью понять механизм проникновения вируса бешенства в мозг инфицированного животного, выявить участки узнавания нАХР гликопротеином вируса и даже использовать эти знания для практического применения его фрагментов. Взаимодействие с нАХР (в первую очередь с $\alpha 7$ подтипом, локализованным в нейронах и иммунных клетках) было также выявлено и подробно исследовалось последние 20 лет для гликопротеина gp120 вируса иммунодефицита человека. Наконец, недавняя пандемия Ковид-19 способствовала активному изучению механизмов проникновения и последующего поражения клеток хозяина вирусом SARS-CoV-2 для быстрой выработки различных эффективных подходов к предотвращению инфицирования и лечения. Хотя основной мишенью для проникновения в клетки данный вирус использует ангиотензин-превращающий фермент-2, взаимодействуя с ним своим оболочечным S-белком, была выявлена также способность последнего к узнаванию некоторых подтипов нАХР. В рамках этих исследований нам удалось показать прямое взаимодействие рецептор-связывающего домена S-белка вируса с мышечным и $\alpha 7$ нейрональным подтипами нАХР с микромолярным сродством. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01051, <https://rscf.ru/project/22-24-01051/>.

Антибактериальные олигонуклеотиды

Стеценко Д.А.^{1,2,*}, Буракова Е.А.^{1,2}, Бизяев С.Н.^{1,2}, Клабенкова К.В.^{1,2}, Держалова А.Ш.^{1,2},
Чжихуэй Г.^{1,2}, Патрушев Д.Э.^{1,2}, Фокина А.А.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*stetsenkoda@bionet.nsc.ru

Распространение лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов обозначено ВОЗ с 2014 г. как одна из серьезнейших угроз для здоровья людей. Широкое распространение в текущее десятилетие госпитальных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* и др. делает разработку новых эффективных средств борьбы с ними особенно актуальной. При недостатке действенных антибиотиков или низкомолекулярных антибактериальных препаратов в отношении особо устойчивых патогенов и прогнозируемого возникновения новых видов устойчивости круг возможных альтернатив для антибактериальной терапии сужается. Производные нуклеиновых кислот, такие как антисмысловые олигонуклеотиды, способные избирательно подавлять экспрессию индивидуальных генов, рассматриваются за рубежом в качестве перспективного инструмента для преодоления бактериальной антибиотикорезистентности. Однако для успешного противодействия бактериальным инфекциям с помощью олигонуклеотидов необходимо в первую очередь обеспечить эффективную доставку препаратов в клетки бактерий.

Целью данной работы является разработка новых подходов к созданию антибактериальных препаратов, способных успешно подавлять рост бактерий, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, на основе научного задела коллектива лаборатории в области синтеза модифицированных аналогов нуклеиновых кислот, принадлежащих к двум основным классам – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) [1, 2] и сульфонилфосфорамидных олигонуклеотидов (СФО) [3, 4], в особенности, мезилфосфорамидных олигонуклеотидов (μ, или MsPA) [5–8].

Работа поддержана РНФ (проект № 22-13-00212). Синтез олигонуклеотидов частично поддержан Министерством науки и высшего образования РФ (проект НГУ FSUS-2020-0035).

Ссылки:

1. Skvortsova, Yu.V.; Salina, E.G.; Burakova, E.A.; Bychenko, O.S.; Stetsenko, D.A.; Azhikina, T.A. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1049.
2. Kupryushkin, M.S.; Filatov, A.V.; Mironova, N.L.; Patutina, O.A.; Chernikov, I.V.; Chernolovskaya, E.L.; Zenkova, M.A.; Pyshnyi, D.V.; Stetsenko, D.A.; Altman, S.; Vlassov, V.V. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **2022**, *27*, 211–226.
3. Burakova, E.A.; Derzhalova, A.Sh.; Chelobanov, B.P.; Fokina, A.A.; Stetsenko, D.A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2019**, *45*, 662–668.
4. Derzhalova, A.; Markov, O.; Fokina, A.; Shiohama, Y.; Zatsepin, T.; Fujii, M.; Zenkova, M.; Stetsenko, D. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1174.
5. Miroshnichenko, S.K.; Patutina, O.A.; Burakova, E.A.; Chelobanov, B.P.; Fokina, A.A.; Vlassov, V.V.; Altman, S.; Zenkova, M.A.; Stetsenko, D.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 1229–1234.
6. Patutina, O.A.; Gaponova (Miroshnichenko), S.K.; Sen'kova, A.V.; Savin, I.A.; Gladkikh, D.V.; Burakova, E.A.; Fokina, A.A.; Maslov, M.A.; Shmendel', E.V.; Wood, M.J.A.; Vlassov, V.V.; Altman, S.; Stetsenko, D.A.; Zenkova, M.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 32370–32379.
7. Hammond, S.M.; Sergeeva, O.V.; Melnikov, P.A.; Zatsepin, T.S.; Stetsenko, D.A.; Wood, M.J.A. *Nucleic Acid Ther.* **2021**, *31*, 190–200.

8. Gaponova, S.; Patutina, O.; Sen'kova, A.; Burakova, E.; Savin, I.; Markov, A.; Shmendel, E.; Maslov, M.; Stetsenko, D.; Vlassov, V.; Zenkova, M. *Cancers*. **2022**, *14*, 4396.

Биополимерные системы доставки лекарственных средств

Скорик Ю.А.* , Дубашинская Н.В.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

*yury_skorik@mail.ru

Доставка лекарственных средств является одной из ключевых задач в фармакологии. Полимерные системы доставки лекарственных средств представляют собой область интенсивных исследований и разработок и стали важным направлением для улучшения эффективности и специфичности доставки лекарственных средств в организме, снижения побочных эффектов. Такие системы имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами доставки лекарств – они позволяют контролировать скорость высвобождения лекарственных средств, увеличивают их стабильность, повышают биодоступность и снижают токсичность. Кроме того, полимерные системы доставки могут быть специально разработаны для доставки лекарств в конкретные области организма или клетки. В докладе рассматриваются полимерные системы доставки различных типов, включая конъюгаты, наночастицы, микросферы, гидрогели и полимерные матрицы [1-4]. Обсуждаются проблемы характеризации и стандартизации исходных полимеров и полимерных систем доставки, особенности использования биополимеров при разработке систем доставки для различных путей введения лекарственных средств в организм. Приводятся примеры полимерных систем доставки, разработанные за последние годы в лаборатории природных полимеров ИВС РАН [5-9]. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-73-20157-П).

Ссылки:

1. Dubashynskaya, N.V.; Skorik, Y.A. Patches as polymeric systems for improved delivery of topical corticosteroids: Advances and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 12980.
2. Dubashynskaya, N.V.; Bokaty, A.N.; Skorik, Y.A. Dexamethasone conjugates: Synthetic approaches and medical prospects. *Biomedicines* **2021**, *9*, 341.
3. Dubashynskaya, N.V.; Skorik, Y.A. Polymyxin delivery systems: Recent advances and challenges. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 83.
4. Dubashynskaya, N.; Poshina, D.; Raik, S.; Urtti, A.; Skorik, Y.A. Polysaccharides in ocular drug delivery. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 22.
5. Dubashynskaya, N.V.; Petrova, V.A.; Sgibnev, A.V.; Elokhovskiy, V.Y.; Cherkasova, Y.I.; Skorik, Y.A. Carrageenan/chitin nanowhiskered cryogels for vaginal delivery of metronidazole. *Polymers* **2023**, *15*.
6. Dubashynskaya, N.V.; Bokaty, A.N.; Gasilova, E.R.; Dobrodumov, A.V.; Dubrovskii, Y.A.; Knyazeva, E.S.; Nashchekina, Y.A.; Demyanova, E.V.; Skorik, Y.A. Hyaluronan-colistin conjugates: Synthesis, characterization, and prospects for medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2022**, *215*, 243-252.
7. Dubashynskaya, N.V.; Raik, S.V.; Dubrovskii, Y.A.; Shcherbakova, E.S.; Demyanova, E.V.; Shasherina, A.Y.; Anufrikov, Y.A.; Poshina, D.N.; Dobrodumov, A.V.; Skorik, Y.A. Hyaluronan/colistin polyelectrolyte complexes: Promising anti-infective drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *187*, 157-165.
8. Dubashynskaya, N.V.; Bokaty, A.N.; Golovkin, A.S.; Kudryavtsev, I.V.; Serebryakova, M.K.; Trulioff, A.S.; Dubrovskii, Y.A.; Skorik, Y.A. Synthesis and characterization of novel succinyl chitosan-dexamethasone conjugates for potential intravitreal dexamethasone delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*.
9. Dubashynskaya, N.V.; Golovkin, A.S.; Kudryavtsev, I.V.; Prikhodko, S.S.; Trulioff, A.S.; Bokaty, A.N.; Poshina, D.N.; Raik, S.V.; Skorik, Y.A. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *158*, 811-818.

Устные доклады

Объединение в один терапевтический режим двух современных технологий лечения злокачественных новообразований

Рузанова В.С.*

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*v.ruzanova.s@yandex.ru

В настоящей работе изучается возможность объединения нескольких современных противоопухолевых технологий в единую терапевтическую платформу при лечении злокачественных новообразований. Современная парадигма предполагает, что ключом к успешной терапии злокачественных новообразований является учет временной динамики молекулярных событий во всем организме, а при иммунотерапии рака основополагающим является индивидуальный иммунный статус организма. Такое новое представление легло в основу технологий, основанных на хронометрической доставке терапевтических агентов к опухоли в зависимости от особенностей опухолевых клеток, а также от иммунного статуса организма. Наиболее яркими из них являются *in situ* вакцинация и метромная малодозовая химиотерапия циклофосфамидом (ММХТ ЦФ). Основной особенностью указанных подходов является их независимость от конкретной мишени или молекулы. Также известно, что обе технологии наиболее эффективны при лечении иммуногенных опухолей. В результате их применения индуцируется интегральный противоопухолевый иммунитет и разрушается проопухолевая активность опухоль-ассоциированной стромы. В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН был разработан подход «Каранахан», в результате применения которого происходит эрадикация стволовых опухолевых клеток (СОК), индуцируется масштабный апоптоз коммитированных опухолевых клеток и развивается противоопухолевый иммунный ответ. Этот подход, как *in situ* вакцинация и ММХТ ЦФ, имеет хронометрический характер и состоит из привязанного к репаративному и клеточному циклам конкретной опухоли введения цитостатика циклофосфана и сложнокпозиционного препарата на основе ДНК. Эффективность технологии «Каранахан» не зависит от иммунного статуса организма и иммуногенности опухоли и направлена на другие терапевтические мишени (СОК и индукция масштабного апоптоза коммитированных опухолевых клеток). Этот факт, а также хронометрический характер терапии «Каранахан», явились основой идеи объединения в один терапевтический режим технологии *in situ* вакцинации и технологии «Каранахан». Предполагалось, что при объединении будет синергично и аддитивно усиливаться вектор противоопухолевого иммунного ответа, элиминироваться СОК и индуцироваться масштабный апоптоз коммитированных опухолевых клеток, что значительно усилит эффективность противоопухолевой терапии. В настоящей работе на модели иммуногенной лимфомы А20 была осуществлена попытка объединения в единый подход технологии *in situ* вакцинации CpG/ α OX40 и технологии «Каранахан». Установлено, что при проведении терапии по технологии «Каранахан» в определенные фазы терапевтического воздействия индуцируется выброс в кровяное русло нейтрофилов и макрофагов, которые при введении в терапию антител к OX40 активируют свой литический потенциал, что приводит к развитию системной воспалительной реакции, полиорганной недостаточности и гибели экспериментальных животных. Корректировка введения антител OX40 относительно времени пикового выброса в кровь фагоцитов позволила полностью элиминировать воспалительный эффект и аддитивно повысить синергичную эффективность противоопухолевой терапии совмещенными технологиями.

Исследование поддержано Зайцевой И.Н., ООО "Эс.Лаб Диагностик" и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации через Институт цитологии и генетики СО РАН (Государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016).

Использование SPR биосенсора для поиска прототипов лекарственных средств

Калужский Л.А.^{1,*}, Цыбрук Т.В.², Яблоков Е.О.¹, Гнеденко О.В.¹, Зелепуга Е.А.³, Кича А.А.³,
Козловская Э.П.³, Иванчина Н.В.³, Гилеп А.А.^{1,2}, Иванов А.С.¹

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

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

*leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

Одним из возможных способов поиска новых потенциальных лекарственных соединений является скрининг библиотек низкомолекулярных соединений различной химической структуры. Поверхностный плазмонный резонанс (Surface Plasmon Resonance, SPR) является методом первого выбора для решения подобных задач, поскольку позволяет регистрировать факт физического взаимодействия соединения с белком-мишенью в режиме реального времени и определять константы скоростей ассоциации и диссоциации комплексов. Часто подобный скрининг выполняется с использованием обширных библиотек, что повышает вероятность нахождения потенциальных соединений-кандидатов. Однако реализация такого подхода сопряжена с генерацией большого объема данных, анализ и интерпретация которых представляют значительную сложность из-за необходимости ручной обработки огромного числа полученных сенсограмм.

Мы выполнили анализ данных по взаимодействию выборки из 31 соединения (Рисунок 1) с CYP51 *C. krusei*, варьируя настройки анализа полученных данных [1].

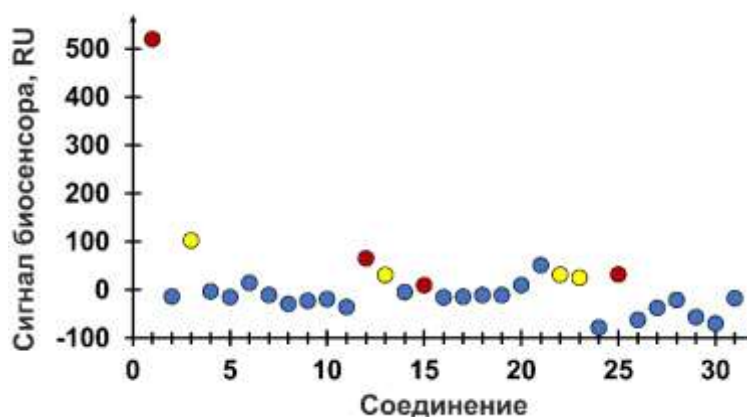


Рисунок 1. Результаты скрининга выборки из 31 соединения природного происхождения на взаимодействие с CYP51 *C. krusei*. Цветами указан результат оценки: красный - положительный результат согласно двум критериям оценки: наклону сенсограммы и наличию медленной диссоциации, жёлтый - положительный результат согласно критерию наличия медленной диссоциации, синий - негативный результат

По результатам проведенных экспериментов, вариант анализа с максимальной чувствительностью для наклона сенсограммы и минимальной для медленной диссоциации выглядит наиболее предпочтительным для селекции наиболее перспективных соединений.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

Ссылки:

1. Калужский, Л.А.; Цыбрук, Т.В.; Яблоков, Е.О.; Гнеденко, О.В.; Зелепуга, Е.А.; Кича, А.А.; Козловская, Э.П.; Иванчина, Н.В.; Гилеп, А.А.; Иванов, А.С. Высокопроизводительный скрининг с помощью оптического SPR-биосенсора низкомолекулярных соединений на взаимодействие с CYP51 *Candida krusei*. *Biomedical Chemistry: Research and Methods* **2023**, 6, e00183–e00183, doi:10.18097/BMCRM00183.

Влияние длительной социальной изоляции на поведение и серотониновую систему мозга у мышей с нокаутом гена фактора некроза опухоли

Устинова У.С.^{1,2,*}, Адонина С.Н.¹, Скотникова А.К.^{1,2}, Базовкина Д.В.¹

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

* ustinova01@gmail.ru

Серотониновая (5-НТ) система участвует в регуляции многих типов поведения. Длительная социальная изоляция может приводить к подавлению функциональной активности 5-НТ системы, активации нейровоспалительных процессов, вызывая нарушения поведения. С другой стороны, провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) способен влиять на синтез серотонина, а нокаут гена *Tnf* изменяет показатели исследовательского и депрессивно-подобного поведения.

Целью работы было изучить эффект длительной социальной изоляции на поведение и 5-НТ систему мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf*. Эксперименты проводили на самцах линии TNF KO и родительской линии C57Bl/6 (дикий тип). Мыши каждой линии были разделены на две группы: контроль (содержание в группах) и опыт (содержание в изолированных клетках в течение шести недель). Поведение оценивали в тестах «открытое поле», «трёхкамерный тест» и «принудительное плавание». Экспрессию генов оценивали в структурах мозга мышей методом ОТ-ПЦР реального времени. Уровни серотонина и его метаболита 5-ГИУК измеряли с помощью ВЭЖХ.

У мышей TNF KO социальная изоляция привела к снижению исследованной площади арены ($p=0,006$), а также повышению такого показателя тревожного поведения, как продолжительность умываний в тесте «открытое поле» ($p=0,046$). В то же время у мышей дикого типа одиночное содержание способствовало снижению предпочтения социального объекта в трехкамерном тесте ($p=0,002$). Также изоляция привела к падению экспрессии гена триптофангидроксилазы 2 в среднем мозге у мышей дикого типа ($p=0,025$) и к повышению экспрессии гена рецептора 5-НТ1А в этой структуре у животных с нокаутом ($p=0,044$). Только мыши с нокаутом демонстрировали снижение содержания 5-НТ в гиппокампе вследствие действия изоляции ($p=0,037$), уровни нейромедиатора и его метаболита 5-ГИУК во фронтальной коре и среднем мозге не зависели от группы мышей.

Полученные результаты демонстрируют, что нокаут гена *Tnf* модулирует эффекты длительной социальной изоляции у мышей на поведение и 5-НТ систему мозга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-15-00051.

Изучение термодинамики межмолекулярных взаимодействий с помощью SPR-биосенсора

Яблоков Е.О.* , Калужский Л.А., Иванов А.С.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва
*evgeyablokov1988@mail.ru

В современных медико-биологических исследованиях значительную роль играет оценка межмолекулярных взаимодействий (ММВ). ММВ представляют собой интерес в контексте системы «лиганд-рецептор», «фермент-ингибитор», «антиген-антитело» и т.д. С практической точки зрения важно знать параметры ММВ антител с антигенами или ингибиторов с ферментами, так как это открывает возможности получения новых лекарственных соединений, либо позволяет оценить механизмы действия уже известных лекарств. Важным параметром ММВ является их термодинамика, а именно изменение свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии в процессе формирования межмолекулярного комплекса. Данные термодинамические параметры характеризуют физические явления, которые протекают в процессе ММВ, что может быть важным для понимания его структуры. С использованием SPR-биосенсора возможно охарактеризовать кинетические константы ММВ, что даёт представление об аффинности межмолекулярного комплекса, характеризуемой равновесной константой диссоциации (K_d). Получение значений K_d в некотором диапазоне температур рабочей среды даёт представление о характере температурной зависимости K_d , которая может быть изображена в виде графика Вант-Гоффа. Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) получают из уравнения (1), зная K_d при 25°C. Используя график Вант-Гоффа и уравнение (2), линейную форму уравнения Вант-Гоффа, можно получить данные об энтальпийной компоненте (ΔH) ММВ. Значение энтропийной компоненты ($-T\Delta S$) получают согласно уравнению (3). Данные о термодинамике ММВ полезны для дополнения результатов моделирования *in silico* (путём селекции подходящих моделей) и данных, основанных на сравнении форм белка, полученных в результате направленного мутагенеза. Также эти результаты могут дополнить данные биохимического тестирования способности низкомолекулярных соединений ингибировать активность целевых ферментов, путём сопоставления термодинамического профиля комплексов известных ингибиторов с целевым ферментом. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad (1)$$
$$\ln K_d = \left(\frac{\Delta H}{R}\right) \left(\frac{1000}{T}\right) - \left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad (2)$$
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Рисунок 1. Уравнения, позволяющие рассчитать термодинамические параметры межмолекулярных взаимодействий

Анализ экспрессии генов, характеризующих клетки В-лимфомы, захватывающие дцДНК, как опухолевые стволовые клетки

Ошихмина С.Г.^{1,*}, Долгова Е.В.², Ефремов Я.Р.¹, Богачев С.С.¹

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*s.oshikhmina@g.nsu.ru

Согласно данным ВОЗ, онкологические заболевания занимают второе место в мире по смертности населения после сердечно-сосудистых. Гематологические злокачественные заболевания возникают в результате бесконтрольной пролиферации клеток в костном мозге или лимфатической системе. Прогрессия гемобластозов приводит к нарушению кроветворения, дисфункции всех систем организма и летальному исходу. Для многих типов злокачественных новообразований, включая лимфомы, было показано наличие в них субпопуляции опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые обладают высокой пролиферативной активностью и вызывают развитие опухолей при ксенотрансплантации. Детекция и элиминация ОСК необходимы для успешного лечения злокачественных новообразований и предотвращения рецидива заболевания. На данный момент не существует универсального маркера для ОСК.

В лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН было обнаружено новое свойство стволовых клеток различного генеза – их способность интернализировать фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК. Для детекции факта интернализации в ОСК в лаборатории был сконструирован и синтезирован дцДНК-зонд, меченный TAMRA-флуорохромом.

В ранних работах лаборатории было показано, что в культуре В-лимфомы, индуцированной вирусом Эпштейна-Барр, содержатся клетки, способные захватывать дцДНК-зонд, меченный TAMRA. Было показано, что TAMRA+ клетки демонстрируют основные признаки ОСК, а именно, являются центрами сферообразования и необходимы для успешной перевивки ксенотрансплантата мышам линии NOD/SCID, который генотипически соответствовал перевиваемым клеткам.

В настоящем исследовании был выполнен последний этап экспериментальной работы, связанный с характеристикой TAMRA+ клеток как ОСК. Была оценена относительная экспрессия генов в TAMRA+ и TAMRA- клетках В-лимфомы. С помощью серии FACS-сортировок клетки культуры были разделены на две субпопуляции по способности интернализировать TAMRA-ДНК-зонд. Из клеток выделяли РНК и проводили РНК-секвенирование, в результате чего был получен список генов, экспрессирующихся в этих клетках. Гены были разбиты на функциональные группы, связанные с различными характеристиками ОСК. Среди этих групп были выделены гены, кодирующие белки, участвующие в сигнальных каскадах, отвечающих за симметричное/асимметричное деление, поддержание низкодифференцированного состояния, эпителиально-мезенхимальную транзицию, антиапоптотические свойства, устойчивость к лекарственным препаратам, Эффект Варбурга и иммуносупрессию.

Показано, что в TAMRA+ клетках В-лимфомы достоверно повышена экспрессия генов Wnt-сигнального пути, связанного с процессами симметричного/асимметричного деления стволовых клеток. Также в TAMRA+ клетках достоверно повышена экспрессия генов сигнального каскада ретиноевой кислоты и транскрипционных факторов, отвечающих за поддержание низкодифференцированного состояния клеток. Активность генов, связанных с эпителиально-мезенхимальной транзицией свидетельствует о промежуточном фенотипе этих клеток.

Молекулярное клонирование, получение и характеристика эстрогенсульфотрансферазы (SULT1E1) и гидроксистероидсульфотрансферазы (SULT2A1) человека

Тумилович А.М.^{1,*}, Цыбрук Т.В.¹, Яблоков Е.О.², Басина В.П.², Гнеденко О.В.²,
Мезенцев Ю.В.², Иванов А.С.², Гилеп А.А.¹

¹Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной
академии наук Беларуси», Минск

²ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

*tumilovicham@gmail.com

Стероидсульфотрансферазы являются ферментами стероидного метаболизма, оказывающими влияние на многие физиологические и патофизиологические процессы, регулируемые стероидными гормонами [1]. Они принимают участие в сульфировании ряда эндогенных и экзогенных соединений - стероидов, нейромедиаторов, желчных кислот и биогенных аминов, а также некоторых лекарств и других ксенобиотиков. Кроме этого, они выполняют ряд важнейших функций, таких как дезактивация ксенобиотиков (в том числе некоторых канцерогенов), регуляция активности стероидных гормонов и нейротрансмиттеров, а также поддержание баланса активных стероидных гормонов в тканях влияя на экспрессию контролируемых этими гормонами генов [2].

Объектами исследования стали эстрогенсульфотрансфераза (SULT1E1) и гидроксистероидсульфотрансфераза (SULT2A1) человека. Нами были сконструированы праймеры к последовательностям кодирующей ДНК генов, оптимизированы условия полимеразной цепной реакции (ПЦР) для данных праймеров. Было проведено молекулярное клонирование генов SULT1E1 и SULT2A1 человека в экспрессионный вектор, оптимизированы условия гетерологической экспрессии, выделения и очистки данных рекомбинантных белков для получения ферментов в препаративных количествах для дальнейших исследований и характеристики.

Были проведены исследования физико-химических свойств, ферментативной активности, белок-лигандных и белок-белковых взаимодействий сульфотрансфераз с цитохромами P450 и их редокс-партнерами, участниками стероидного метаболизма. Реконструкция ферментативной активности показала, что ферменты активны. Были обнаружены взаимодействия исследуемых цитохромов с иммобилизованными сульфотрансферазами (SULT1A2, SULT1E1). Выявлены случаи изменения активности SULT в присутствии исследуемых цитохромов и их редокс-партнеров стероидогенеза человека. Был проведен *in silico* анализ белок-белковых взаимодействий, получены 3D модели взаимодействующих белков, выявлены потенциальные участки связывания.

Большой интерес в дальнейших исследованиях для нас представляет оценка производных стероидов морских организмов в качестве субстратов и модуляторов активности сульфотрансфераз человека, с целью поиска в организме человека ранее не обнаруженных ортологов данных стероидных соединений.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, проект № X23M-008.

Ссылки:

1. Falany, C.N. Molecular enzymology of human liver cytosolic sulfotransferase. *Trends Pharm Sci* **1991**, *12*, 255-259.
2. Hobkirk, R. Steroid sulfotransferase and steroid sulfatases: characteristics and biological roles. *Can J Biochem Cell Biol* **1985**, *63*, 1127-1144.

Первичная культура клеток увеальной меланомы для оценки роли VEGF-A в качестве маркера повышенного риска метастазирования и потенциальной мишени для противоопухолевой терапии

Жильникова М.В.^{1,2,*}, Троицкая О.С.¹, Коваль О.А.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*m.zhilnikova@g.nsu.ru

Увеальная меланома (УМ) представляет собой опухоль, развивающуюся из меланоцитов сосудистой оболочки глаза. Несмотря на низкую частоту встречаемости (1-9 случаев на миллион человек в год), УМ является крайне агрессивной опухолью, поскольку у более половины пациентов развиваются метастазы в первые 1-2 года. При этом системной терапии для метастатической УМ на настоящий момент не разработано. Показано, что в прогрессировании и метастазировании УМ одну из ведущих ролей играет фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A, стимулирующий ангиогенез. Анти-VEGF-A препараты находят широкое применение в клинике для лечения глазных патологий, связанных с неоваскуляризацией. Препараты данного класса (например, бевацизумаб), применяют для лечения пациентов с УМ в качестве адъювантной терапии после лучевой терапии.

Целью исследования являлось изучение продукции клетками УМ человека мембранных рецепторов и факторов роста, вовлеченных в процессы метастазирования опухоли. Исследование проводили на первичных культурах клеток увеальной меланомы, полученных из хирургического материала пациентов.

Производство клетками первичных культур УМ эндотелиального фактора роста VEGF-A оценивалось путем иммуноферментного анализа. Чувствительность клеток УМ к анти-VEGF-A препаратам оценивали в экспериментах *in vitro*. Для тестирования использовали антитело к VEGF-A брелуцизумаб и рекомбинантный белок на основе внеклеточного домена VEGF-рецептора афлиберцепт. Достоверное ($p < 0,05$) снижение жизнеспособности клеток наблюдалось при добавлении афлиберцепта и брелуцизумаба в концентрации 2 мг/мл и 6 мг/мл, соответственно.

Кроме того, методом проточной цитометрии были исследованы мембранные рецепторы семейства ErbB эпидермального фактора роста и молекулы клеточной адгезии Mel-CAM, также вовлеченные в процессы диссеминации клеток УМ и являющиеся важными маркерами неблагоприятных прогнозов заболевания. В культуре УМ были выявлены популяции HER2- и HER3-положительных клеток, составляющие 24% и 26%, соответственно, однако популяция EGFR⁺-клеток практически отсутствовала. Кроме того, у 85% клеток в культуре УМ показано присутствие на поверхности молекул клеточной адгезии Mel-CAM. Следовательно, HER2, HER3 и Mel-CAM могут рассматриваться как потенциальные мишени для тестирования на исследованной клеточной культуре УМ противоопухолевых препаратов.

Таким образом, первичные культуры клеток УМ обладают молекулярными маркерами, указывающими на повышенный риск метастазирования, и демонстрируют чувствительность к препаратам, направленным на блокировку VEGF-A.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-14-00285.

Белок-белковые и белок-лигандные взаимодействия стероид-гидроксилаз *M. tuberculosis*

Варакса Т.С.^{1,*}, Грабовец И.П.¹, Струшкевич Н.В.², Гилеп А.А.¹

¹Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск

²Сколковский институт науки и техники, Москва

*varaksa.tanya@gmail.com

Широкое распространение полирезистентных к существующим лекарственным средствам штаммов возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* привело к поиску новых мишеней в лекарственной терапии. Среди них выделяют цитохромы P450 (cytochromes P450, CYPs) - ферменты, участвующие в метаболизме лекарств. Геном микобактерий содержит 20 таких ферментов и только для части из них установлена биохимическая роль. С целью установления функции орфанных белков (белков с неизвестной функцией) или малоизученных белков микобактерий мы провели комплексные структурно-функциональные исследования трех ферментов *M. tuberculosis* для которых было ранее показано потенциальное участие в метаболизме C27-стероидов. Нами были получены препараты белков стероид-гидроксилаз микобактерий CYP124, CYP125, CYP142. Исследована их субстратная специфичность в отношении стероидов и их производных. Осуществлён поиск перспективных азотсодержащих соединений, структурные мотивы которых могут быть использованы в дальнейшем для создания ингибиторов CYPs. Проведены исследования в области белок-белковых взаимодействий ферментов с белковыми редокс-партнёрами из разных организмов и установлены оптимальные условия для реконструкции ферментативной активности *in vitro* [1]. Также было установлено, что CYP124, CYP125, CYP142 метаболизируют иммуноактивные стероиды человека, и таким образом потенциально модулируют иммунный ответ человека [2]. В качестве перспективных исследований предполагается изучение действия соединений из морских организмов на данные ферменты. Установлено, что некоторые соединения из организмов морских беспозвоночных могут действовать как натуральные антибиотики, способные подавлять рост и развитие микобактерий, обладая антимикобактериальной активностью [3]. Мы предполагаем, что соединения из морских организмов будут взаимодействовать с CYPs микобактерий. Известно, что морские организмы поражает *Mycobacterium marinum*, предковая форма *M. tuberculosis*, который содержит в геноме ортологичные CYPs. Разработанный нами подход позволит установить участие CYPs в метаболическом потенциале микобактерий в отношении широкой группы биологически активных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ №X23РНФ-090 и гранта РФФИ № 23-44-10009.

Ссылки:

1. Sushko T. et. al. A new twist of rubredoxin function in *M. tuberculosis*. *Bioorganic Chemistry* **2021**, *109*, 104721. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104721.
2. Varaksa T. et. al. Metabolic Fate of Human Immunoactive Sterols in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology* **2021**, *433*, 166763. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.166763.
3. Sahile H.A. et. al. Screening of diverse marine invertebrate extracts identified Lissoclinotoxin F, Discodermin B, and other anti-*Mycobacterium tuberculosis* active compounds. *The Journal of Antibiotics* **2022**, *75*, 213 – 225.

Разработка CAR-T-клеточного препарата для терапии злокачественных новообразований крови

Иванова Н.О.* , Сердюк Я.В., Дианов Д.В., Фефелова Е.И., Боголюбова А.В.
ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва
*halfblood394@gmail.com

Иммунотерапия генно-модифицированными Т-клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR), является перспективной областью исследований. Впечатляющие результаты были достигнуты при лечении онкогематологических заболеваний, в частности, острого В-лимфобластного лейкоза (B-ALL), хронического лимфолейкоза (CLL) и неходжкинской лимфомы (NHL) аутологичными CAR-T клетками, специфичными к молекуле CD19, а также множественной миеломы CAR-T лекарственным препаратом со специфичностью к антигену BCMA [1].

CAR-T-клетки представляют собой Т-лимфоциты, которые генетически модифицированы и экспрессируют на своей поверхности химерный рецептор (CAR), нацеленный на определенный антиген. CAR представляет собой химерную молекулу, состоящую из сигнальных доменов Т-клеточного рецептора (TCR) и слитого с ними внеклеточного антиген-распознающего домена, в качестве которого может выступать одноцепочечный фрагмент (scFv) моноклонального антитела. CAR-T-клетки способны эффективно распознавать несущие антиген клетки и уничтожать их. В отличие от распознавания, опосредованного TCR, распознавание антигена с помощью CAR не зависит от главного комплекса гистосовместимости (MHC) [2].

В настоящей работе был оптимизирован процесс разработки и получения CAR-T-клеточного лекарственного препарата со специфичностью к антигену CD19, имеющего в качестве костимуляторного и сигнального доменов последовательности CD28 и CD3 ζ , соответственно [3]. В качестве линий-продуцентов лентивирусного вектора использовали адгезивную линию клеток эмбриональной почки человека HEK293T и суспензионную линию Expi293F. Экспрессионную плазмиду котрансфецировали в клетки тремя упаковочными плазмидами (pLP1(gag/pol), pLP2 (rev) и pLP/VSV-G (оболочка VSV-G) с использованием полиэтиленимина (PEI) или липофектамина (GenJect-39).

Показано, что разработанные протоколы получения CAR лентивирусного вектора позволяют нарабатывать лентивирусные частицы (CAR-LV) с инфекционным титром TU 6-25 mln/ml (со средним значением TU 16,6 mln/ml). Такие титры позволяют эффективно трансдуцировать Т-клеточные линии (Jurkat E6.1) и первичные Т-клетки здоровых доноров и пациентов лентивирусным вектором, несущим конструкт CAR, достигая высокого уровня трансдукции первичных Т-клеток (17-70% при MOI=10). Полученный CAR-T клеточный продукт демонстрирует высокий уровень экспансии *in vitro*, а также киллинговую активность в функциональных тестах *in vitro* с использованием в качестве мишеней клеточных линий, несущих на своей поверхности антиген CD19 (Raji, NALM6, K562).

Результатом данной работы стало начало доклинических исследований эффективности и безопасности анти-CD19 CAR-T-клеточной терапии и подготовка к клиническим исследованиям.

Ссылки:

1. Todorovic Z., Todorovic D., Markovic V. et al. CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Curr Oncol.* **2022**, 29, 5.
2. Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* **2021**, 11, 69.
3. Zhang C., Liu J., Zhong J. F. & Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomark. Res.* **2017**, 5, 22.

Исследование действия амисульприда на серотониновые 5-HT7 рецепторы и нейротрофическую систему мозга в модели сверхэкспрессии тау-белка с мутацией [R406W] у мышей

Комарова А.А.*

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск
*assolina.komarova@gmail.com

Тау-белок участвует в стабилизации микротрубочек, влияет на аксональный транспорт и рост аксонов. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что конститутивная активность 5-HT7 серотонинового рецептора индуцирует гиперфосфорилирование тау-белка и его последующую агрегацию посредством взаимодействия с тау-киназой CDK5. Среди биомаркеров нейродегенеративных процессов широко известным является нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), уровень мРНК и белка которого снижается при болезни Альцгеймера в коре больших полушарий и гиппокампе. Процессы роста и развития нейронов регулируются в том числе и рецепторами – тирозинкиназой B (TrkB) и общим рецептором нейротрофина p75, связывающими BDNF и proBDNF соответственно. Амисульприд – препарат, использующийся при лечении шизофрении и депрессии. Антидепрессантный эффект амисульприда в том числе объясняется блокированием 5-HT7 рецептора, что позволяет предположить наличие терапевтического эффекта препарата при таупатиях.

Целью данной работы является изучение применения амисульприда при повышении экспрессии гена, несущего мутацию [R406W] тау-белка, в префронтальной коре на регуляцию когнитивных функций и на уровень мРНК генов, участвующих в развитии таупатии (*Htr7* и *Cdk5*), а также генов *Bdnf*, *Ntrk2* (ген рецептора TrkB) и *Ngfr* (ген рецептора p75 NTR) у мышей. Эксперименты проводили на 2-месячных самцах мышей линии C57BL/6J. Животные были разделены на две группы – «опытной» в префронтальную кору вводили вирусный конструктор AAV-тау[R406W], меченый eGFP, «контрольной» группе вводили AAV-eGFP. Каждая группа была разделена на 3 подгруппы, которым в течение 5 недель внутрибрюшинно вводили препарат в дозах 3 мг/кг, 10 мг/кг или физиологический раствор.

При исследовании поведения животных в тесте «recency test» было обнаружено, что мыши, которым вводили конструктор с тау[R406W] и физиологический раствор, реже подходили к менее новому объекту, чем мыши с eGFP и физиологическим раствором ($p=0.061$). Амисульприд не восстановил данный показатель.

Введение конструктора AAV-тау[R406W] привело к значительному повышению уровня мРНК генов *Htr7* ($p=0,011$), *Htr1a* ($p=0,020$) и *Cdk5* ($p=0,040$) во фронтальной коре по сравнению с контрольными животными. В то же время применение амисульприда в дозе 10 мг/кг у животных с AAV-тау[R406W] вызвало снижение уровня мРНК генов *Htr7* ($p=0,006$), *Htr1a* ($p=0,0001$) по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор.

Кроме того, было выявлено снижение уровня мРНК генов, кодирующих белки BDNF ($p=0,004$) и TrkB ($p=0,045$), в префронтальной коре при введении вектора AAV-тау[R406W]. Однако применение препарата в различных дозах также снизило уровень мРНК этих генов в коре мышей без таупатии. Интересным результатом является повышение уровня мРНК гена рецептора p75 NTR ($p=0,002$) у здоровых мышей при введении амисульприда в дозе 10 мг/кг.

Таким образом, применение амисульприда при сверхэкспрессии тау[R406W] привело к снижению уровня мРНК генов *Htr7* и *Cdk5* в префронтальной коре, что позволяет рассматривать препарат в качестве агента для восстановления нормальной функции тау-белка. Однако влияние амисульприда на уровень мРНК генов, кодирующих BDNF, TrkB и рецептор p75, отражает негативный эффект препарата при длительном применении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-15-00011.

Влияние нокаута гена *Tnf* на серотониновую систему мозга при длительном и одноразовом введении бактериального липополисахарида

Адолина С.Н.^{1,*}, Скотникова А.К.², Куликова Е.А.¹, Базовкина Д.В.¹

¹ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*sveta-adonina@yandex.ru

Многочисленные исследования свидетельствуют о тесном двустороннем взаимодействии между иммунной и центральной нервной системами. Одним из важных посредников между этими системами является провоспалительный цитокин - фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF). При активации иммунной системы введением бактериального липополисахарида (ЛПС) уровень TNF в организме возрастает. При этом TNF участвует в развитии комплекса нарушений поведения, которое сопровождается изменениями функциональной активности серотониновой (5-НТ) системы мозга.

Целью данной работы было исследование влияния нокаута гена, кодирующего TNF, на поведение и 5-НТ систему мозга у мышей после длительного введения ЛПС внутривентриально. А также исследование влияния ЛПС через 24 часа после введения. В качестве материала исследования были использованы самцы мышей линии C57Bl/6 (дикий тип) и линии C57Bl/6-*Tnf*^{-/-} (с нокаутом гена фактора некроза опухоли, TNF KO). Продолжительное введение ЛПС (250 мкг/кг, i.p., 5 дней) не повлияло на двигательную и исследовательскую активности в тесте «открытое поле», депрессивноподобное поведение в тесте «принудительное плавание», предпочтение нового объекта в тесте «новый объект». Влияние ЛПС достоверно снижало исследовательскую активность в закрытых рукавах у мышей нокаутной линии в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» ($p < 0,05$) и значительно ухудшило обучаемость животных в тесте «водный лабиринт Морриса»: у мышей линии TNF KO: показатели обучения у контрольной и опытной групп линии C57Bl/6 улучшились на третий и четвертый дни обучения ($p < 0,05$). Мыши контрольной группы нокаутной линии уже на второй день успешно находили платформу ($p < 0,05$), а мыши TNF KO опытной группы – только на третий ($p < 0,01$) и четвертый ($p < 0,001$) дни. Нокаут гена *Tnf* приводил к повышению уровня мРНК гена *Ido1*, кодирующего индоламин-2,3-деоксигеназу, ($p < 0,05$) во фронтальной коре и снижению уровня мРНК гена *Htr2a* ($p < 0,05$) в среднем мозге. У мышей обеих линий ЛПС не оказал действия на экспрессию ключевых для серотониновой системы мозга генов *Htr1a*, *Htr2a*, *Htr7*, *Tph2* и *Slc6a4*, кодирующих рецепторы 5-НТ1А, 5-НТ2А, 5-НТ7, триптофангидроксилазу 2 и транспортер серотонина, соответственно. Однако, было найдено, что введение ЛПС снижало уровень мРНК гена *Ido1* ($p < 0,05$), во фронтальной коре самцов линии TNF KO. Нокаут гена *Tnf* приводил к повышению уровня серотонина во фронтальной коре ($p < 0,05$), гиппокампе и среднем мозге. В результате введения бактериального эндотоксина индекс метаболизма серотонина (5-ГИУК/серотонин) повышался для гипоталамуса ($p < 0,05$) и среднего мозга ($p < 0,05$) только у мышей линии TNF KO. Кратковременное введение ЛПС с изъятием структур мозга через 24 часа дало достоверное повышение индекса метаболизма серотонина ($p < 0,05$) и уровня 5-ГИУК ($p < 0,05$) в среднем мозге, гиппокампе и коре у животных линии C57Bl/6, однако не отмечается подобных изменений у животных нокаутной линии. В тесте «Открытое поле» отмечается снижение исследовательской и двигательной активности у животных линии C57Bl/6, без наблюдения подобных изменений у нокаутной линии. Полученные данные свидетельствуют о влиянии нокаута гена *Tnf* на чувствительность животных введению воспалительного агента на уровне поведения и функционирования серотониновой системы. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-15-00051).

Амидные производные солоксолонна как новые ингибиторы высоко агрессивного фенотипа мультиформной глиобластомы

Одаренко К.В.^{1,*}, Саломатина О.В.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.², Зенкова М.А.¹, Марков А.В.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск

*k.odarenko@yandex.ru

Мультиформная глиобластома является наиболее агрессивной опухолью головного мозга, медианная выживаемость при которой составляет 15 месяцев. Несмотря на использование комбинированного метода лечения, включающего хирургическую резекцию, радиотерапию и химиотерапию с темазоломидом, у большинства пациентов развивается рецидив заболевания. Причинами этого являются инфильтрация опухолевых клеток в окружающие ткани мозга, препятствующая их полному удалению, и формирование популяции раковых стволовых клеток (РСК), восстанавливающих опухоль после окончания лечения [1]. Ранее нами были разработаны производные тритерпеноида солоксолон метила с введенными по положению С-30 амидными фрагментами, способные проникать через гематоэнцефалический барьер и снижать рост глиобластомы путем индукции апоптоза и подавления неоангиогенеза. Одно из соединений, солоксолон триптаид (СТА), снижало миграцию и клоногенный потенциал клеток глиобластомы *in vitro*, что говорит о потенциальной способности амидов солоксолонна регулировать опухолевую инфильтрацию и стволовость соответственно [2]. Целью настоящего исследования являлся анализ воздействия амидов солоксолонна на клетки глиобластомы с высоко агрессивным фенотипом: совершивших переход к более инвазивному мезенхимальному фенотипу (далее – глиально-мезенхимальный переход, ГМП) или проявляющих стволовые свойства. На первом этапе был проведен скрининг анти-ГМП активности амидов солоксолонна на модели клеток глиобластомы человека U87, стимулированных трансформирующим фактором роста бета-1 (TGF- β 1). В результате анализа было выявлено лидерное соединение Jil-46, несущее толильную группу, эффективно блокирующее в нетоксичных концентрациях TGF- β 1-стимулированное изменение клеточной морфологии, потерю адгезивных свойств и transwell-миграцию. Установлено, что Jil-46 модулирует профиль маркеров ГМП, снижая экспрессию N-кадгерина, фибронектина, Slug и β -катенина и повышая экспрессию OLIG2. Анализ влияния Jil-46 на стволовые свойства клеток U87 в 3D-культуре показал, что Jil-46 эффективно ингибирует рост как первичных, так и вторичных сфероидов и приводит к двукратному сокращению популяции РСК. Помимо этого, установлено, что Jil-46 обладает значительным цитотоксическим потенциалом, вызывая апоптотическую гибель 35% и 80,6% клеток U87 при использовании тритерпеноида в концентрациях 1 μ M и 2 μ M соответственно. При сочетанном применении Jil-46 показал синергетический эффект с токсичностью темозоломида в отношении клеток U87 (комбинаторный индекс = 5,75 (метод Блисса)). Таким образом, амидное производное солоксолонна Jil-46 можно рассматривать в качестве потенциального кандидата для адьювантной терапии, ингибирующего инвазивный потенциал и стволовые свойства клеток глиобластомы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант №23-14-00374).

Ссылки:

1. Fedele, M.; Cerchia, L.; Pegoraro, S.; Sgarra, R.; Manfioletti, G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2746.
2. Markov, A. V.; Ilyina, A.A.; Salomatina, O. V.; Sen'kova, A. V.; Okhina, A.A.; Rogachev, A.D.; Salakhutdinov, N.F.; Zenkova, M.A. Novel Soloxolone Amides as Potent Anti-Glioblastoma Candidates: Design, Synthesis, *In silico* Analysis and Biological Activities *In vitro* and *In Vivo*. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 603.

Разработка методов получения простых эфиров диффрактаевой кислоты

Дивейкина А.А.^{1,2,*}, Исмангулова Д.Ю.^{1,2}, Филимонов А.С.², Лузина О.А.², Салахутдинов Н.Ф.²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск

*a.diveikina@g.nsu.ru

Диффрактаевая кислота (Рисунок 1) является одним из основных вторичных метаболитов многих лишайников и относится к классу депсидов. Исследования, посвященные её биологической активности, немногочисленны. Известно, что диффрактаевая кислота обладает умеренными антибактериальными и инсектицидными свойствами, а также противовоспалительной и гепатопротекторной активностями.

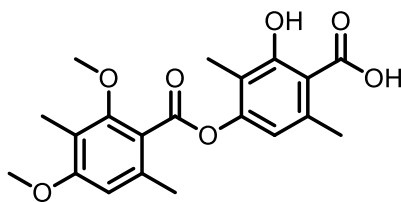


Рисунок 1. Структура диффрактаевой кислоты

В литературе описано очень небольшое количество производных диффрактаевой кислоты, полученных гидролизом депсидной связи и синтезом её метиловых эфиров по гидроксильной и карбоксильной группам. В данной работе была поставлена задача разработать методы синтеза простых эфиров по свободной гидроксильной группе диффрактаевой кислоты. Однако, депротонирование такой гидроксильной группы происходит с большим трудом, и поэтому для её алкилирования требуется проведение дополнительных стадий синтеза, заключающихся в защите соседней свободной карбоксильной группы.

В настоящей работе был разработан подход к получению целевых соединений. Обнаружено, что при использовании метильной защиты возникают трудности в деметилировании после введения объемного заместителя по соседней гидроксильной группе. Поэтому было предложено вводить бензильную защиту, что позволило нам получить ряд целевых соединений. В качестве алкилирующих гидроксильную группу агентов, нами были использованы различные алкилгалогениды, содержащие гетероциклический фрагмент, введение которого может повысить активность целевых соединений в отношении РСВ. Однако доступность и разнообразие таких реагентов существенно ограничено, поэтому нами также был предложен альтернативный подход к синтезу простых эфиров диффрактаевой кислоты, который заключался в создании универсального интермедиата с простой эфирной связью, содержащего алкильный заместитель с терминальным атомом галогена, доступным для реакции с различными нуклеофилами, доступность и разнообразие которых существенно выше. На основе такого интермедиата была синтезирована дополнительная серия простых эфиров диффрактаевой кислоты.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России.

РНК зависимая репарация ДЦР, как механизм действия нового радиопротекторного препарата

Риттер Г.С.*

Институт цитологии и генетики РАН, Новосибирск

*labmolbiol@mail.ru

Ранее были опубликованы результаты исследования нового радиопротекторного препарата, основанного на двуцепочечной фракции РНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Препарат дцРНК обладает выраженными экстренным и пролонгированным радиозащитными свойствами, обеспечивая экспериментальным мышам 100% выживаемость при облучении через час и на 4 сутки после введения препарата и 60% выживаемость при облучении на 8 и 12 сутки абсолютно летальной дозой радиации.

На данный момент была дана подробная характеристика активной субстанции препарата, а также установлена клеточная мишень, воздействие на которую обуславливает радиозащитный эффект дцРНК [1, 2]. Не ясным остается молекулярный механизм действия нового радиопротектора.

Наиболее эффективные радиопротекторы экстренного действия осуществляют защиту путем индукции гипоксии (Б-190), либо выступая в роли «серных ловушек», оттягивая на себя урон, наносимый радикалами (WR-2721) [3].

Судя по имеющимся данным, препарат РНК нельзя причислить ни к первому, ни ко второму виду радиопротекторов. Также характер поведения нового радиопротектора не удовлетворяет другим возможным механизмам радиопротекции, таким как активация Toll-like рецептор опосредованная иммуностимуляция.

Нами было обнаружено, что препарат дцРНК через кровоток попадает в ядра стволовых гемопоэтических клеток костного мозга [4]. Данный факт, а также имеющиеся литературные данные по теме репарации ДНК при участии молекул экзогенной РНК [5], указывают на то, что радиопротекторный механизм дцРНК заключается в участии молекул дцРНК в репарации двуцепочечных разрывов геномной ДНК стволовой клетки.

В данной работе мы провели пилотные эксперименты, указывающие на то, что препарат действительно влияет на репарацию двуцепочечных разрывов и, что именно этим обусловлено сохранение кроветворной системы и выживаемость экспериментальных мышей.

Ссылки:

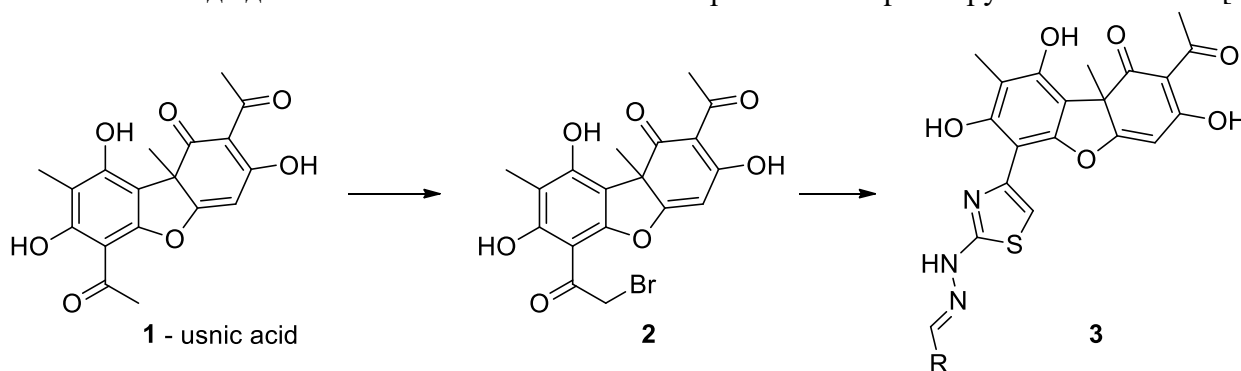
1. Ritter G. S. et al. Characterization of biological peculiarities of the radioprotective activity of double-stranded RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Radiation Biology*. **2020**. 96. 1173-1191.
2. Dubatolova T. D. et al. Changes in the number and morphology of blood cells in mice pretreated with RNA preparations and exposed to 8 Gy of gamma radiation. *International Journal of Radiation Research*. **2022**. 20. 361-368.
3. Васин М. В. Противолучевые лекарственные средства. М.: ГИУВ МО РФ. **2010**.
4. Ritter G. S. et al. Impact of Double-Stranded RNA Internalization on Hematopoietic Progenitors and Krebs-2 Cells and Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*. **2023**. 24. 4858.
5. Meers C., Keskin H., Storici F. DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question. *DNA Repair*. **2016**. 44. 17–21.

Гидразонотиазолы на основе усниновой кислоты в качестве потенциальных ингибиторов основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2

Филимонов А.С. *, Лузина О.А., Маренина М.К., Мешкова Ю.В., Яровая О.И., Хвостов М.В.
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск
*alfil@nioch.nsc.ru

Хотя пандемия COVID-19 официально завершена и распространение коронавирусной инфекции больше не считается чрезвычайной ситуацией международного масштаба, риск новых вспышек инфекции по-прежнему существует. Поэтому поиск новых эффективных средств против вируса SARS-CoV-2 всё ещё является актуальной задачей медицинской химии. Особое внимание в последние два года уделяется поиску ингибиторов основной протеазы (3CLpro) вируса SARS-CoV-2 среди соединений природного ряда и их производных.

Усниновая кислота является вторичным метаболитом лишайников родов *Usnea*, *Cladonia* и других. Она обладает широким спектром биологической активности: противомикробной, противоопухолевой, противовоспалительной и противовирусной [1]. Опубликованные данные расчётов свидетельствуют о перспективах (+)-усниновой кислоты, а также её производных в качестве лиганда для активного сайта связывания протеазы 3CLpro вируса SARS-CoV-2 [2].



В настоящей работе мы синтезировали набор гидразонотиазолов на основе (+)- и (-)-усниновых кислот с ароматическими, гетероароматическими (тиофеновый, пиридиновый) и терпеновыми фрагментом R в качестве заместителя гидразоновой части молекулы. Среди полученных производных были найдены ингибиторы 3CLpro вируса SARS-CoV-2, действующие в микромолярном диапазоне концентраций.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России.

Ссылки:

1. Luzina, O.A.; Salakhutdinov, N.F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2016**, *42*, 115-132. Luzina, O.A.; Salakhutdinov, N.F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2016**, *42*, 249-268.
2. Prateeksha, G.; Rana, T.S.; Asthana, A.K.; Singh, B.N.; Barik, S.K. Screening of cryptogamic secondary metabolites as putative inhibitors of SARS-CoV-2 main protease and ribosomal binding domain of spike glycoprotein by molecular docking and molecular dynamics approaches. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1240*, 130506, doi:10.1016/j.molstruc.2021.130506.

Новые полифторированные производные олигонуклеотидов по реакции Штаудингера

Клабенкова К.В.^{1,2,*}, Захрямина А.Е.², Буракова Е.А.^{1,2}, Бизяев С.Н.^{1,2}, Стеценко Д.А.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*klabenkovakv@bionet.nsc.ru

В настоящее время получение модифицированных олигонуклеотидов привлекает повышенное внимание исследователей. Терапевтическое действие большинства известных модифицированных аналогов олигонуклеотидов основано на использовании антисмыслового механизма – ингибировании трансляции за счет высокоспецифичного связывания с комплементарным участком последовательности мРНК гена-мишени с последующим блокированием биосинтеза конкретного белка. Необходимую биологическую устойчивость *in vivo* антисмысловым олигонуклеотидам обеспечивает химическая модификация межнуклеотидной фосфатной группы. В нашей лаборатории ведутся исследования по использованию реакции Штаудингера взаимодействия азидов с фосфиттриэфирами для функционализации межнуклеотидного положения в олигонуклеотиде в процессе твердофазного синтеза [1, 2]. Основной задачей в рамках данного подхода выступает целенаправленный поиск новых производных олигонуклеотидов, способных проникать в клетки без трансфекционного агента. Полифторированные соединения характеризуются необычными свойствами, которые способствуют их широкому применению в промышленности и научных исследованиях. В данном исследовании были впервые изучены производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие перфтор-1-октансульфонилфосфорамидную или 2,2,2-трифторэтансульфонилфосфорамидную группы в межнуклеотидном положении (Рисунок 1).

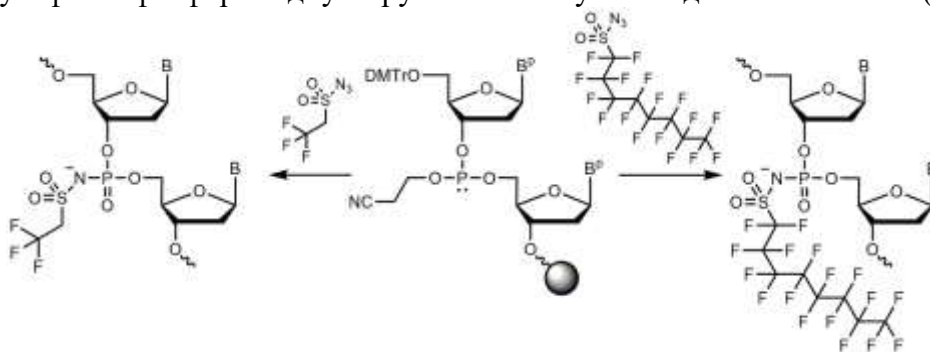


Рисунок 1.

Было показано, что данные соединения образуют комплементарные комплексы как с ДНК, так и с РНК, обладающие несколько меньшей устойчивостью, чем природные. Цитотоксичность полифторированных олигонуклеотидов слабо отличалась от немодифицированных аналогов. Олигонуклеотиды с двумя перфтороктильными группами были способны эффективно проникать в клетки человека без трансфекционного агента.

Работа поддержана РФФ (проект № 22-13-00212). Синтез олигонуклеотидов частично финансировался Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект НГУ FSUS-2020-0035).

Ссылки:

1. Прохорова, Д.В.; Челобанов, Б.П.; Буракова, Е.А.; Фокина, А.А.; Стеценко, Д.А. *Биоорг. химия* **2017**, *43*, 45–50.
2. Burakova, E.A.; Derzhalova, A.Sh.; Chelobanov, V.P.; Fokina, A.A.; Stetsenko, D.A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2019**, *45*, 662–668.

Молекулярно-генетическая характеристика популяции энтеровируса Коксаки А24, циркулирующей на территории РФ

Яковчук Е.В.^{1,*}, Шустова Е.Ю.¹, Козловская Л.И.^{1,2}

¹ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Москва

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

*yakochuklisa@gmail.com

Энтеровирусы человека (ЭВ) принадлежат к семейству Picornaviridae, роду *Enterovirus*, и объединяют более 100 патогенных для человека типов, которые подразделяются на четыре вида: энтеровирусы А, В, С и D. Несмотря на то, что ЭВ обычно не приводят к тяжёлым заболеваниям, высокая скорость эволюции их геномов часто приводит к появлению новых вариантов, способных вызывать новые формы инфекции и вспышки. Вирус Коксаки А24 (CVA24) относится к виду С. Вариант этого вируса CVA24v является одной из основных причин острого геморрагического конъюнктивита (ОГК). Вспышки ОГК, ассоциированные с CVA24v до 1985 г. ограничивались Юго-Восточной Азией и Индией. Затем вирус распространился, вызывая крупные вспышки на Тайване, в Японии, в Центральной Америке, в Африке и некоторых странах Европы [1]. Целью данного исследования является молекулярно-генетическая характеристика изолятов CVA24, выделенных на территории РФ в настоящее время.

В ходе работы исследовали клинический материал, полученный в рамках программы по надзору за энтеровирусными инфекциями в 2021-2022 гг. Энтеровирусы изолировали в культуре клеток RD. Типирование ЭВ осуществляли секвенированием фрагмента участка генома, кодирующего капсидный белок VP1 по методу Сэнгера. Последовательности геномных фрагментов анализировали с использованием программы SeqMan. Тип определяли с помощью онлайн ресурса BLAST. Нуклеотидные последовательности образцов типа CVA24 были отобраны для филогенетического анализа. Для этого последовательности VP1 выравнивали по рамке считывания с помощью программ BioEdit v7.0.5.2 и Mega X с референсными последовательностями, полученными из Genbank. Построение филогенетических деревьев с использованием метода молекулярного датирования проводили с помощью программы BEAST v1.4.8.

В результате работы было типировано 434 образца ЭВ, из них 8 – относятся к CVA24. Для проведения филогенетического анализа отобрали 6 последовательностей. Из базы данных GenBank получены 44 референсных последовательности, полученных в 1957-2020 гг, включая прототипный штамм CVA24 Joseph (AF081311), и прототипные штаммы CVA24v: DN-19 (AF081347) и D90457. Все исследуемые образцы вошли в группу CVA24, корневое положение в которой занял прототипный штамм Joseph. В кластер с исследуемыми вирусами также вошли образцы из России, Китая и стран Африки, тогда как группа CVA24v включала образцы из Европы, Южной и Северной Америки, и других регионов. 5 из 6 исследуемых образцов сформировали кластер с возрастом ближайшего общего предка 27,64 лет (HPD 95%). Таким образом, в результате данного исследования, на территории России не было обнаружено представителей варианта CVA24v, ассоциированного с ОГК и другими тяжелыми заболеваниями.

Ссылки:

1. Triki H. Molecular characterisation of a coxsackievirus A24 that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis, Tunisia 2003. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**. *13*. 176–182.

Применение подхода дизайн эксперимента (DOE) для стандартизации технологии выделения и очистки экстракционного органопрепарата

Казакова А.В.^{1,*}, Ищук С.А.¹
ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург
*Angelina.Kazakova@geropharm.com

Согласно современным тенденциям фармацевтической разработки, сформулированным в руководстве ICH Q8, определение проектных полей является частью систематизированного подхода углубленной стратегии контроля качества препаратов. Проектное поле (design space) представляет собой многомерную комбинацию параметров процесса, обеспечивающую получение препарата надлежащего качества. Оно может быть представлено в виде графиков поверхности отклика либо в виде контурных диаграмм.

Для определения проектного поля рекомендуется использовать статистические подходы, например, дизайн эксперимента (design of experiments). Основная идея подхода состоит в том, чтобы одновременно изучить влияние многих факторов на систему в рамках набора запланированных экспериментов, а затем соединить результаты с помощью математической модели. Это позволяет получать наибольшее количество информации из собранных данных, экономить время и сокращать затраты материальных ресурсов на оптимизацию процесса.

В данной работе определяли проектные поля для стадий выделения и очистки экстракционного препарата. Технология включала в себя четыре последовательные стадии: экстракция, осаждение, фильтрация и сушка, измельчение. Для каждой из четырех стадий были выбраны факторы, которые могут оказывать влияние на качество и количество получаемого препарата (6, 3, 5 и 3 соответственно). Далее были определены диапазоны (уровни) факторов и выбраны планы экспериментов. Для стадий экстракции и фильтрации были выбраны дробнофакторные планы, включающие в себя 19 экспериментов, для стадий осаждения и измельчения – полнофакторные, 11 экспериментов. В качестве откликов использовали показатели количественного определения, определяемые методами спектрофотометрии и RP-HPLC, и молекулярно-массового распределения, определяемые методами капиллярного электрофореза и SE-HPLC.

В результате экспериментов были получены модели хорошего качества, позволившие описать технологию. Были определены условия, позволяющие увеличить выход продукта на 25% в рамках действующих технологических инструкций за счет изменения температурного режима осаждения. Общая длительность процесса также была снижена на 19 часов за счет изменения длительности стадии экстракции. Предсказанные оптимальные условия были проверены экспериментально – проведением экспериментов в большем масштабе. Полученные значения выходов продукта подтвердили надежность построенных моделей. Таким образом, были установлены критичные параметры процессов и их диапазоны, а также целевые показатели качества полупродуктов, позволяющие управляемо получать продукт, соответствующий требованиям нормативной документации.

Применение генно-модифицированных штаммов S19 для оценки иммунитета к полиовирусам у детей, привитых различными вакцинами против полиомиелита

Карпова Е.В.^{*}, Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Байкова О.Ю., Мустафина А.Н.-И.,
Козловская Л.И.

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва

*evg_karпова@mail.ru

Полиомиелит – инфекционное заболевание, вызываемое полиовирусами типов 1, 2 и 3, ассоциированное с повреждением центральной нервной системы, которое может приводить к развитию параличей, инвалидизации и смерти. Заболеванию чаще всего подвержены дети. С середины XX века для профилактики полиомиелита применяются вакцины: живая оральная аттенуированная (ОПВ) на основе штаммов Сэбина и инактивированная (ИПВ) на основе вирулентного дикого полиовируса (дПВ) [1]. С 1988 года действует Глобальная инициатива по ликвидации полиомиелита (ГИЛП), которая добилась почти полного исчезновения случаев, вызванных дикими полиовирусами на планете. Таким образом, в настоящее время лаборатории и вакцинные производства являются потенциальными источниками полиовирусов в мире, свободном от полиомиелита, что может вызвать повторное появление данного заболевания после завершения программы по его ликвидации. Для уменьшения использования вирусов при производстве вакцин и в лабораторных исследованиях были предложены генетически модифицированные штаммы S19 на основе генома вакцинного штамма Сэбина 3 типа с увеличенной аттенуацией и генетической стабильностью при пассировании, а также сниженной способностью размножаться в кишечнике человека при физиологической температуре (37°C) [2]. Затем на основе этой конструкции были изготовлены генетически модифицированные вирусы типов 1 и 2 путём замены структурной области на последовательность соответствующего штамма Сэбина.

В данной работе была оценена возможность применения новых штаммов S19 для проведения реакции нейтрализации сыворотками вакцинированных людей в культуре клеток Нер-2 (Cincinnati) по сравнению со штаммами Сэбина. Для этого проводили сравнительный анализ титров антител в сыворотках крови детей, вакцинированных от полиомиелита по разным схемам и разными вакцинами (ОПВ и ИПВ), собранных в Омской области.

Нейтрализующие антитела были выявлены во всех сыворотках крови детей. Средние геометрические титры нейтрализующих антител для каждой индивидуальной сыворотки достоверно не различались при постановке со штаммами Сэбина и штаммами S19 ($p < 0,05$). Таким образом, замена штаммов Сэбина генно-модифицированными штаммами S19 допустима для оценки поствакцинального иммунитета у детей в постановке реакции нейтрализации.

Ссылки:

1. Knowlson S, Burlison J, Giles E, Fox H, Macadam AJ, Minor PD. New Strains Intended for the Production of Inactivated Polio Vaccine at Low-Containment After Eradication. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, 12.
2. Minor PD. The polio eradication programme and issues of the endgame. *Gen Virol.* **2012**, *93*, 457–474.

Природные соединения из морских организмов в исследовании никотиновых ацетилхолиновых рецепторов

Кудрявцев Д.С.*

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

*kudryavtsev@ibch.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются важным элементом регуляции работы центральной нервной и иммунной систем. Эндогенный лиганд этих рецепторов — ацетилхолин — второй по значимости после глутамата возбуждающий нейромедиатор. Несмотря на высокую значимость и перспективность nAChR в качестве терапевтической мишени для лечения широкого спектра патологий (от хронической боли и воспаления, до болезни Альцгеймера), не решенными в фундаментальной науке задачами являются расшифровка механизма влияния связывания лигандов на открытие поры ионного канала и детальное установление механизма передачи сигнала от ортостерического участка связывания до ионного канала. Открытие новых лигандов nAChR с разнообразными химическими структурами и новыми механизмами действия обеспечивает исследования nAChR ценными инструментами и является тем самым актуальной задачей.

В ходе нашей совместной работы с ТИБОХ ДВО РАН были обнаружены новые агонисты и антагонисты nAChR $\alpha 7$ и мышечного подтипов. Макалувамин G из морской губки рода *Zyzzia* показал субмикромольное сродство к мышечному nAChR ($K_i \sim 500$ нМ) в опытах по радиолигандному конкурентному анализу. Исследования его влияния на функциональную активность мышечного nAChR показали смешанный конкурентно-бесконкурентный тип ингибирования. Молекулярное моделирование указало на важность аминокислотного остатка G153 в сайте связывания nAChR, а моделирование кинетики одиночных каналов на основе цепей Маркова подтвердило предположение о связывании с аллостерическим участком связывания.

В области поиска агонистов nAChR нами был проведен рациональный дизайн аналогов природного 6-бромгипафорина, для которого свойства агониста nAChR ранее были открыты в совместной работе ТИБОХ ДВО РАН (Владивосток) и ИБХ РАН (Москва). Более 15-ти новых соединений были синтезированы и протестированы *in vitro*, была продемонстрирована увеличенная по сравнению с природным 6-бромгипафоринотом потентность в отношении $\alpha 7$ nAChR. Опыты в нескольких моделях воспаления *in vivo* показали анальгетическую и противовоспалительную активность. Таким образом, разнообразные морские организмы являются богатым природным источником лигандов nAChR.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-74-10092, <https://rscf.ru/project/21-74-10092/>.

Оценка противовирусной активности производных бенгальского розового

Колпакова Е.С.^{1,2,*}, Шустова Е.Ю.¹, Камзеева П.Н.², Аралов А.В.², Козловская Л.И.^{1,3}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита), Москва

²Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова, Москва

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

*katerina.kolp@gmail.com

Фотосенсибилизирующие соединения являются перспективным классом химических веществ для лечения вирусных инфекций, а также для инактивации вирусов при производстве вакцин. Одним из таких соединений является бенгальский розовый – анионный ксантеновый краситель, способный к генерации синглетной формы кислорода, запускающей каскад свободнорадикальных реакций с повреждением биологических структур. При этом такие фотодинамические повреждения не вызывают значительной цитотоксичности, поскольку эукариотические клетки, в отличие от вирусов, имеют репарационные системы.

Для оценки влияния бенгальского розового и его производных на репродукцию вирусов была проведена фенотипическая оценка противовирусной активности *in vitro* серии соединений с гидрофильными и гидрофобными заместителями против оболочечных вирусов разных семейств: SARS-CoV-2 и вируса Чикунгунья. По результатам скрининга все 16 исследуемых производных проявили активность со значениями EC₅₀ в микро- и наномолярном диапазоне. Более того, индекс селективности самого активного производного с октильной группой превышал 230 000 против вируса Чикунгунья.

Для изучения механизма действия этих соединений были проведены эксперименты Time-of-Addition, т.е. определение зависимости активности соединений от времени добавления в реакции подавления бляшкообразования SARS-CoV-2 и вируса Чикунгунья. По результатам этих экспериментов было показано, что соединения действуют на вирионы, ингибируя стадию проникновения. Ввиду способности бенгальского розового и его производных генерировать синглетный кислород под воздействием света, можно предположить, что механизмом действия этих соединений является повреждение мембраны вириона, что, в итоге, делает его неспособным к слиянию с клеточной мембраной.

Противовоспалительный пептид морской анемоны *Stomphia coccinea*

Калина Р.С.^{1,*}, Гладких И.Н.¹, Климович А.А.¹, Кожевникова Ю.В.¹, Кветкина А.Н.¹, Рогожин Е.А.², Кошелев С.Г.², Дмитренко П.С.¹, Козлов С.А.², Лейченко Е.В.¹

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

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

*kalinarimma@gmail.com

Воспаление и боль являются первой реакцией организма на вредоносные внешние воздействия или внутренние патологии, а также наиболее частой причиной обращения за медицинской помощью по данным ВОЗ. Противовоспалительные и обезболивающие препараты занимают лидирующие позиции по объемам потребления населением, однако распространенность болевого синдрома и воспалительных заболеваний неуклонно растет [1]. В связи с этим увеличивается интерес к поиску и изучению новых токсинов из природных источников, например, из ядовитых секретов морских и наземных животных. Несколько таких пептидов, включая анальгетики, уже получили одобрение в качестве лекарственных средств [2]. Недавно из глубоководной морской анемоны *Stomphia coccinea* нами был выделен пептид AnmTX Sco 9a-1 [3]. Sco 9a-1 является первым охарактеризованным компонентом яда *S. coccinea*. Он представляет собой пептид с молекулярной массой 2960 Да, состоящий из 28 аминокислотных остатков, включая четыре остатка цистеина, которые формируют два дисульфидных мостика, а также остаток гидроксипролина. Sco 9a-1 входит в группу из 14 токсинов-модуляторов ионных каналов (TRPA1 и ASIC3). Пространственная структура токсинов представляет собой три классических β -поворота и скрученную β -шпильку. Эксперименты *in vivo* демонстрируют, что Sco 9a-1 не токсичен для млекопитающих при внутривенном введении в дозе 15 мг/кг. Кроме того, в тесте «Открытое поле» введение пептида в дозах 0,01 – 1 мг/кг снижает уровень тревожности животных и стимулирует их ориентировочно-исследовательскую активность. Эффективность Sco 9a-1 в дозе 0,1 мг/кг в моделях каррагинан-индуцированного воспаления и тепловой гипералгезии сравнима с эффективностью коммерческого препарата «Диклофенак» в дозе 1 мг/кг. Введение Sco 9a-1 также предотвращает рост уровня провоспалительных цитокинов, в частности TNF- α . Электрофизиологическое тестирование влияния Sco 9a-1 на токи протон-чувствительных каналов крысы, ASIC1a и ASIC3, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, показало, что эффекты пептида в моделях *in vivo* не связаны с изменением активности ASICs. После определения молекулярных мишеней Sco 9a-1, этот пептид может стать перспективным прототипом для разработки новых активных молекул, сочетающих противовоспалительное и анальгетическое действие.

Работа поддержана Грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 13.1902.21.0012 (075-15-2020-796).

Ссылки:

1. Varrassi, G.; Alon, E.; Bagnasco, M.; Lanata, L.; Mayoral-Rojals, V.; et al. Towards an effective and safe treatment of inflammatory pain: a Delphi-guided expert consensus. *Adv Ther.* **2019**, *36*, 2618–2637.
2. Herzig, V.; Cristofori-Armstrong, B.; Israel, M.R.; Nixon, S.A.; Vetter, I.; King, G.F. Animal toxins - Nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochem Pharmacol.* **2020**, *181*, 114096.
3. Kalina, R.S.; Gladkikh, I.N.; Klimovich, A.A.; Kozhevnikova, Y.V.; Kvetkina, A.N.; et al. First anti-inflammatory peptide AnmTX Sco 9a-1 from the swimming sea anemone *Stomphia coccinea*. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1705.

Получение ингибитора α -амилаз, магнификамида, из морской анемоны *Heteractis magnifica* и изучение его свойств

Попкова Д.В.^{1,*}, Синцова О.В.¹, Климович А.А.¹, Гладких И.Н.¹, Кусайкин М.И.¹,
Бороздина Н.А.², Шайхудинова Э.Р.², Дьяченко И.А.², Лейченко Е.В.¹

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

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

* daria.vladipo@yandex.ru

Сахарный диабет представляет серьезную и распространенную проблему в области здравоохранения, которая затрагивает все возрастные группы и является фактором риска множества патологий, в том числе со стороны нервной, сердечно-сосудистой и выделительной систем. Предполагается, что к 2045 году число больных сахарным диабетом увеличится до 783 миллионов, в связи с чем разработка эффективных препаратов для терапии метаболического расстройства остается актуальной задачей фармакологии и биомедицины. Одним из способов контроля уровня глюкозы в крови является применение препаратов, ингибирующих действие α -глюкозидаз, однако используемые в клинической практике терапевтические препараты обладают относительно низкой эффективностью, в связи с чем требуется применение высоких доз действующего вещества, что приводит к возникновению побочных эффектов со стороны разных систем органов. Выделенные из морских анемонов пептидные ингибиторы α -амилаз, хелиантамид [1] и магнификамид [2], обладают значительно более селективным и эффективным действием, а устойчивость к протеолитическому расщеплению и длительному воздействию низкого рН делает их перспективными кандидатами для создания на их основе антидиабетических лекарственных препаратов. Магнификамид из морской анемоны *Heteractis magnifica* является селективным прочно связывающимся ингибитором α -амилаз млекопитающих с $K_i = 3,06 \pm 0,65$ нМ по отношению к панкреатической α -амилазе человека, что на три порядка ниже, чем у современного терапевтического препарата, акарбозы (PrecoseTM/GlucobayTM). Эксперименты ИТС (изотермическая титрационная калориметрия) подтвердили образование прочно связанных комплексов магнификамида со слюнной и панкреатической α -амилазами человека с константами диссоциации 0,11 мкМ и 0,1 нМ соответственно. Методом спектроскопии кругового дихроизма изучена термостабильность магнификамида и определена точка конформационного перехода во вторичной структуре пептида, соответствующая 85°C. Результаты анализа острой токсичности пептида и теста «Открытое поле» подтвердили безопасность его перорального и внутривенного введения и отсутствие влияния на центральную нервную систему животных в дозах до 2 мг/кг. Эффективность магнификамида в дозе 0,005 мг/кг в модели индуцированного стрептозоцином сахарного диабета 1 типа была сопоставима с эффективностью акарбозы в дозе 3 мг/кг. Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 21-74-20147.

Ссылки:

1. Tysoe, C.; Williams, L.; Keyzers, R.; et al. Potent human α -amylase inhibition by the β -defensin-like protein helianthamide. ACS Cent. Sci. **2016**, 2, 154-161.
2. Sintsova, O.; Gladkikh, I.; Kalinovskii, A.; Magnificamide, a β -defensin-like peptide from the mucus of the sea anemone *Heteractis magnifica*, is a strong inhibitor of mammalian α -amylases. Mar. Drugs. **2019**, 17, 542-556.

Использование подхода OSMAC с целью поиска новых вторичных метаболитов морских микроскопических грибов

Лещенко Е.В.^{1,2,*}, Боркунов Г.В.^{1,2}, Шлык Н.П.², Худякова Ю.В.¹, Попов Р.С.¹

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

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*Leshchenko.ev@dvfu.ru

Морские микроскопические грибы являются перспективным источником потенциально новых природных соединений с широким спектром биологической активности [1]. Изменение условий культивирования микроскопических грибов является одним из направлений стратегии OSMAC («один штамм, много соединений»), согласно которой каждый микробный штамм может продуцировать большое разнообразие соединений при культивировании в различных условиях. Проведено культивирование морского гриба *Penicillium velutinum* ZK-14 на рисовой среде с использованием морской воды и с добавлением солей металлов (Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+}). Культуры грибов вместе со средой были экстрагированы этилацетатом, профильтрованы и очищены на колонке с силикагелем С18 в метаноле. Полученные экстракты были проанализированы при помощи ВЭЖХ-УФ/МС и исследованы на их цитотоксичность в отношении нормальных и опухолевых клеток, а также на ростингибирующую активность в отношении дрожжеподобного гриба *S. albicans*, в результате чего для препаративного культивирования была отобрана среда с добавлением соли Fe^{3+} . Из этилацетатного экстракта *Penicillium velutinum* ZK-14 на рисовой среде с использованием морской воды и с добавлением соли Fe^{3+} были выделены соединения **1** и **2**.

Брутто-формула соединения **1** была установлена как $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ (m/z 235.1701 [$\text{M} - \text{H}$]⁻) и подтверждена данными спектра ^{13}C ЯМР. Полный анализ одно- и двумерных спектров ЯМР позволил идентифицировать соединение **1** как известный терпен (4*S*,5*R*,7*S*)-4,11-дигидрокси-гвайа-1(2),9(10)-диен [2]. Этот сесквитерпен, содержащий 1(2),9(10)-сопряженную двойную связь ранее был выделен из стеблей *Solanum erianthum* [2] и цветочных бутонов *Daphne genkwa* [3]. Согласно литературным данным, из гриба *Penicillium velutinum* и других грибов секции *Exilicaulis* терпены ранее не выделялись [4-6]. Брутто-формула соединения **2** была установлена как $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (m/z 293.1313 [$\text{M} - \text{H}$]⁻). Эта информация и полный анализ ^{13}C и ^1H спектров ЯМР позволили идентифицировать соединение **2** как известный тио-дикетопиперазин сароклазин А [7]. Сароклазин А ранее был выделен из мангрового гриба *Sarocladium kiliense* HDN11-84 и обладает свободной амидной группой, которая была впервые обнаружена в серосодержащих ароматических дикетопиперазинах (DKPs).

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-73-00190.

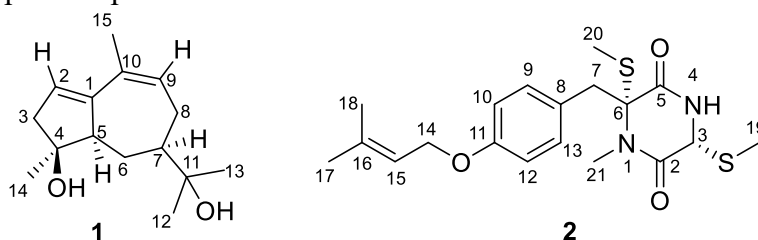


Рисунок 1. Метаболиты, выделенные из *Penicillium velutinum* ZK-14 культивированного с добавлением Fe^{3+}

Ссылки:

1. Peng, X.Y. et al. *MLST* **2021**, 3, 363–374.
2. Li, H. et al. *Chirality* **2016**, 28, 259-263.
3. Zhang, C.-Y. et al. *Nat. Prod. Res.* **2018**, 32, 2893-2899.
4. Chen, Y. et al. *Org. Lett.* **2018**, 20, 3741-3744.
5. Chen, Y. et al. *J. Nat. Prod.* **2022**, 85, 1442-1447.
6. Wubshet, S.G. et al. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1302, 34-39.
7. Li, F. et al. *Arch. Pharmacol. Res.* **2018**, 41, 30-34.

Актинопорины как основа противоопухолевых препаратов

Павленко А.П.^{*}, Кветкина А.Н., Лейченко Е.В.

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

*apavlenko141@gmail.com

Актинопорины – цитолитические полипептиды, которые являются одними из наиболее представленных токсинов ядовитого секрета морских анемонов. Данные соединения обладают способностью образовывать поры в цитоплазматических мембранах, содержащих сфингомиелин, что приводит к гибели клеток. Известно, что повышенное содержание этого сфинголипида на наружной мембране имеют опухолевые клетки. Сфингомиелин в составе клеточной мембраны образует плотную сеть меж- и внутримолекулярных водородных связей, чрезмерная плотность которой нарушает ингибирование межклеточных контактов, меж- и внутриклеточные сигналы и восприимчивость к иммунным клеткам хозяина и медиаторам [1]. Процесс лежит в основе инициации онкогенеза, роста опухолей, уклонения их от иммунного ответа хозяина и приводит к устойчивости опухолей к терапии.

Еще одной особенностью актинопоринов является наличие RGD-мотива – сайта узнавания интегринов, которые в том числе играют ведущую роль в прогрессировании и метастазировании опухолей.

Ранее было обнаружено, что Hct-S3, актинопорин морской анемоны *Heteractis magnifica* (= *Heteractis crista*), обладает эффективной антимиграционной активностью [2]. Выдвинуто предположение, что такая активность может быть следствием не только пороформирующей способности токсина, но и взаимодействия актинопорина с белками цитоскелета, интегринными. Сочетание альтернативных сайтов связывания в одной молекуле, вероятно, обуславливает эффективную антимиграционную активность этих соединений, а также может способствовать снижению устойчивости опухолей к лекарственной терапии.

В данной работе для выяснения механизма антимиграционной активности была исследована биологическая активность актинопоринов с мутациями в RGD-мотиве – Hct-S3(RGA) и Hct-S3(AGA). Цитотоксическая активность актинопоринов была исследована на клеточной линии карциномы кишечника человека HT-29. Hct-S3(RGA) в концентрациях до 10 мкМ оказался нетоксичным, в то время как Hct-S3(AGA) снижал жизнеспособность клеток на 50% в концентрации 4,7 мкМ, и был более токсичным, чем актинопорин, не содержащий мутаций (IC₅₀ = 6,8 мкМ [2]). Антимиграционная активность была исследована на клеточной линии HT-29. В нетоксичных концентрациях (от 0,01 до 0,5 мкМ) актинопорины подавляли миграцию клеток от 25 до 42%. Максимальная антимиграционная активность наблюдалась в концентрации 0,01 мкМ. Следует отметить, что антимиграционная активность актинопоринов, содержащих мутации в RGD-мотиве, снижается по сравнению с актинопорином без мутаций.

Ссылки:

1. Tallima, H.; Azzazy, H.M.E.; El Ridi, R. Cell surface sphingomyelin: key role in cancer initiation, progression, and immune evasion. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 1–12.
2. Kvetkina, A.; Malyarenko, O.; Pavlenko, A.; Dyshlovoy, S.; von Amsberg, G.; Ermakova, S.; Leychenko, E. Sea anemone *Heteractis crista* actinoporin demonstrates *in vitro* anticancer activities and prevents HT-29 colorectal cancer cell migration. *Molecules* **2020**, *25*, 1–13.

Позиционирование на единичной биомолекуле с целью исследования ферментативной активности методом атомно-силовой микроскопии

Иванова И.А.^{*}, Ершова М.О., Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О., Арчаков А.И.
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича», Москва
^{*}i.a.ivanova@bk.ru

Визуализация отдельных биомолекул является современным инструментом исследований в энзимологии единичных молекул. Актуальность данного направления обусловлена возможностью наблюдать за отдельными стадиями или промежуточными продуктами биохимических реакций в экспериментах с одной молекулой [1], что имеет определенные преимущества перед традиционно используемыми в энзимологии методами, регистрирующими сигнал от ансамбля молекул. Распределения молекулярных свойств ансамбля обычно широки как из-за статического, так и динамического беспорядка. Разделение статического и динамического беспорядка позволит улучшить понимание взаимосвязи между динамикой и функциями молекул ферментов [1]. Микроскопическая визуализация с высоким разрешением позволит детально изучить проявление динамического беспорядка, который выходит за рамки классической химической кинетики.

Одним из нанотехнологических инструментов, позволяющих визуализировать единичные молекулы, является метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). В экспериментах по изучению ферментативной активности методом АСМ регистрируется флуктуация высот белковых молекул в процессе функционирования. Флуктуации высот находятся в диапазоне десятых долей нанометров [2]. При регистрации таких малых величин необходимо, в том числе, учитывать влияние дрейфа системы. Инструментом, позволяющим провести позиционирование на одном и том же объекте с компенсацией дрейфа положения сканера по осям ХУ, является функция «NanoTrack» в системе Dimension FastScan Bio[™] (Bruker).

В настоящей работе показано, что функция позиционирования «NanoTrack» позволяет избежать смещения целевого объекта – единичной молекулы белка, в кадре в среднем на 4,2 мкм в процессе сканирования в течение 14 минут. Полученный результат подтверждает принципиальную возможность проведения покадровых измерений для изучения активности целевых единичных молекул. Также показано, что позиционирование на одном и том же объекте позволяет производить расчет флуктуаций полученных высот в заданной области молекулы за все время сканирования. Это позволило сформировать модель для обработки данных, включающую в себя наибольшее количество точек, характеризующих высоту биомолекулы. Разработанная модель является более совершенной по сравнению с наблюдением за максимальной высотой биомолекулы в одной точке в процессе измерений.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

Ссылки:

1. Xie X. S., Lu H. P. Single-molecule enzymology. *Journal of Biological Chemistry* **1999**. 274, № 23, 15967-15970.
2. Ivanov, Y. D., Bukharina, N. S., Pleshakova, T. O., Frantsuzov, P. A., Krokhin, N. V., Ziborov, V. S., & Archakov, A. I. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. *Biophysics* **2011**, 56, 892-896.

Пространственная структура и динамика ингибитора амилаз из морской анемоны *Heteractis magnifica*

Меньшов А.С.^{1,*}, Парамонов А.С.², Шенкарев З.О.^{2,3}, Попкова Д.В.¹, Синцова О.В.¹,
Гладких И.Н.¹, Лейченко Е.В.¹

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

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

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный

*al.bc-mensh@yandex.ru

Основным источником углеводов для человека является крахмал, который в пищеварительной системе расщепляется амилазами и другими ферментами до глюкозы, и в таком виде поступает в кровеносную систему. В то же время при диабете усвоение глюкозы из крови нарушено. Одной из стратегий, направленной на повышение качества жизни людей, больных диабетом, является целенаправленное ингибирование действия α -амилаз. В современном мире разработка лекарственных препаратов невозможна без знания структуры как мишени действия, так и самого агента, их комплекса. Большинство известных белковых ингибиторов α -амилаз позвоночных являются пептидами бактерий рода *Streptomyces*, состоящими из 74-78 аминокислотных остатков (а.о.), но данные пептиды не могут быть применены в клинической практике из-за их высокой иммуногенности. В 2015 году методом рентгеноструктурного анализа был охарактеризован комплекс панкреатической амилазы и хелиантамида, пептида, состоящего из 44 а.о., выделенного из морской анемоны *Stichodactyla helianthus* [1]. Позже из морской анемоны *Heteractis magnifica* были выделены его гомологи, магнификамиды, также ингибирующие α -амилазы [2].

В данной работе с целью установления пространственной структуры магнификамида использовали метод спектроскопии ЯМР. Для идентификации спиновых систем аминокислотных остатков, задания ограничений двугранных углов ϕ , ψ , χ_1 , определения дальних контактов NOE были проведены двумерные эксперименты ^{15}N - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HSQC, TOCSY, гомоядерный NOESY и трехмерные гетероядерные эксперименты ^{15}N - ^1H TOCSY–HSQC, ^{15}N - ^1H NOESY–HSQC, HNHA и HNHB. Было получено 20 минимизированных по энергии структур, каждая из которых представляет собой β -лист, состоящий из четырех β -тяжей, соединенных двумя β -изгибами и одной 3_{10} -спиралью. С целью определения параметров внутримолекулярной динамики для ядер ^{15}N амидных групп основной цепи были определены величины гетероядерного NOE, скорости продольной R_1 ($1/T_1$) и поперечной R_2 ($1/T_2$) релаксации импульсными последовательностями переноса намагниченности с ядер ^{15}N на ^1H . Расчет конформационной подвижности согласно безмодельному подходу Липари-Сзабо показал существование практически жесткой структуры, в том числе и изгиба Y9-V12, который является ключевым при ингибировании амилазы согласно известной кристаллической структуры комплекса хелиантамида со свиной панкреатической α -амилазой [1].

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 21-74-20147.

Ссылки:

1. Tysoe, C.; Williams, L.K.; Keyzers, R.; Nguyen, N.T.; Tarling, C.; Wicki, J.; Goddard-Borger, E.D.; Aguda, A.H.; Perry, S.; Foster, L.J.; et al. Potent Human α -Amylase Inhibition by the β -Defensin-like Protein Helianthamide. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 154–161.
2. Sintsova, O.; Gladkikh, I.; Kalinovskii, A.; Zelepuga, E.; Monastyrnaya, M.; Kim, N.; Shevchenko, L.; Peigneur, S.; Tytgat, J.; Kozlovskaya, E.; et al. Magnificamide, a β -Defensin-Like Peptide from the Mucus of the Sea Anemone *Heteractis magnifica*, Is a Strong Inhibitor of Mammalian α -Amylases. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 542.

Обработка данных АСМ-визуализации с помощью стандартных и специально разработанных программных обеспечений

Ершова М.О.^{*}, Иванов Ю.Д., Плешакова Т.О.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва
^{*}mo.ershova@mail.ru

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) предоставляет широкие возможности по изучению биомолекул в нативном состоянии. С помощью АСМ возможно определение широкого спектра характеристик биобъектов: морфология (размеры), жесткость, гидрофобность, поверхностный потенциал. Высота визуализируемых объектов, полученная с высоким разрешением на уровне ангстрем, используется, в том числе, для оценки аффинных свойств исследуемых биомолекул. Так, эффективность комплексообразования зонд/мишень оценивается на основе данных регистрации высоты визуализируемых объектов после стадии иммобилизации молекулярного зонда и после стадии инкубации в растворе антигена [1]. Данные АСМ-измерений – серия изображений (сканов, кадров) различных участков поверхности образца, содержащих исследуемые биообъекты. Как правило, в обработку поступают десятки сканов, содержащие тысячи объектов, что является достаточным для интерпретации результатов АСМ-анализа одного образца. Для обработки АСМ-данных существует ряд стандартных программных обеспечений (ПО): Gwyddion (<http://gwyddion.net>), FemtoScan (http://en.nanoscopy.ru/software/femtoscanner_online), ImageAnalysis (NT-MDT) и NanoScope (Bruker). Стандартные ПО предоставляют множество инструментов для обработки данных, однако существенным их недостатком является возможность анализа только одного АСМ-скана. Но необходима совокупная обработка одной или нескольких серий сканов, которые позволяют набрать статистически значимые данные по характеристикам объектов. По полученным статистическим данным, например, строятся графики функций распределения объектов по высотам, на основе которых оценивается вклад объектов с определенной высотой. С другой стороны, обработка большого количества сканов необходима при высокочувствительном анализе и регистрации малого количества объектов на поверхности, которые могут быть локализованы на различных, разрозненных участках поверхности. Для повышения достоверности полученных данных обработка серии АСМ-сканов нужна также и при регистрации площадей или объемов визуализируемых объектов. В докладе освещены разработанные с участием ИБМХ ПО, предназначенные для решения вышеозначенной проблемы. ПО «одАСМ» (разработано ИБМХ, рег. номер. 2010613458), позволяет обрабатывать данные по нескольким АСМ-изображениям, результаты обработки предоставляются в текстовом виде. Однако расчёты требуют большое количество вычислительных ресурсов и времени обработки. Недостатки ПО «одАСМ» учтены при разработке ПО «Recognite» (разработано в ИБМХ совместно с МИФИ), с помощью которого расчеты проводятся намного быстрее, но получение данных возможно только для высоты объектов, не предусмотрено расчета площади и объемов визуализируемых объектов. В настоящее время ведётся разработка ПО «SiMol», которое позволит строить графики распределения как по высотам, так и по площадям и объемам найденных объектов. Кроме того, в ПО «SiMol» предусмотрен вывод полученных результатов в графическом виде, что существенно упрощает интерпретацию полученных данных. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2). При разработке ПО использованы данные, полученные с помощью АСМ, входящих в УНУ «Авогадро» (<https://www.ibmc.msk.ru/megascience/unu>).

Ссылки:

1. Pleshakova, T.O.; Bukharina, N.S.; Archakov, A.I.; Ivanov, Y.D. Atomic Force Microscopy for Protein Detection and Their Physicochemical Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1142. <https://doi.org/10.3390/ijms19041142>.

Взаимодействие α -амилазы с магнификамидом: изучение *in silico*

Панина И.С.^{1,*}, Чугунов А.О.¹, Ефремов Р.Г.¹, Гладких И.Н.², Лейченко Е.В.²

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

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

*irinaspanina@gmail.com

Природные биоактивные вещества представляют большой интерес как альтернатива синтетическим соединениям для лечения различных заболеваний. Магнификамид — небольшой пептид (44 а.о., 4770 Да), недавно обнаруженный в яде морской анемоны *Heteractis magnifica*, — ингибирует активность α -амилаз в наномолярном диапазоне концентраций [1] и может быть использован для лечения состояний, ассоциированных с сахарным диабетом. Чтобы понять природу ингибирующего эффекта магнификамида, мы с помощью методов компьютерного моделирования предсказали структуру его комплекса с α -амилазой поджелудочной железы свиньи (РРА) и охарактеризовали структурно-динамические особенности их взаимодействия.

Аминокислотная последовательность магнификамида имеет высокое сходство (84%) с ранее обнаруженным мощным ингибитором α -амилаз — хелиантамидом, для которого известна структура его комплекса с РРА [2], используемая в качестве референса в настоящей работе. С помощью комбинации методов ансамблевого белок-белкового докинга, молекулярной динамики (МД) и картирования физико-химических свойств поверхностей макромолекул мы выявили три наиболее вероятных варианта комплекса α -амилазы с магнификамидом, один из которых соответствует комплексу с хелиантамидом. Общим для всех вариантов является погружение в полость РРА, содержащую каталитические остатки, гидрофобной области пептида, содержащей ингибирующий мотив YIYN. У всех комплексов лишь несколько стабильных межмолекулярных связей (4–5 водородных связей, 1–2 стекинга взаимодействия), но высокая комплементарность контактирующих поверхностей молекул-партнеров. Аналогичные данные были получены для комплекса с хелиантамидом. Таким образом, высокая аффинность изучаемых пептидов к РРА достигается за счет соответствия геометрии и физико-химических свойств поверхностей молекул.

Расчеты МД проводились в программном пакете Gromacs версии 2020.06 с использованием параметров полноатомного силового поля (Charmm36). Ансамблевый докинг выполнялся в программе ZDOCK версии 3.0.2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-74-20147).

Ссылки:

1. Sintsova, O.; Gladkikh, I.; Kalinovskii, A.; et al. Magnificamide, a β -Defensin-Like Peptide from the Mucus of the Sea Anemone, Is a Strong Inhibitor of Mammalian α -Amylases. *Mar. Drugs* **2019**, *17*.
2. Tysoe, C.; Williams, L.K.; Keyzers, R.; et al. Potent Human α -Amylase Inhibition by the β -Defensin-like Protein Helianthamide. *ACS Cent Sci* **2016**, *2*, 154–161.

Влияние добавки М в Ni-M катализаторах на морфологию и структуру углеродных нановолокон, полученных пиролизом трихлорэтилена

Потылицына А.Р.^{1,*}, Бауман Ю.И.¹, Шубин Ю.В.², Попов А.А.², Руднева Ю.В.²,
Ведагин А.А.¹, Мишаков И.В.¹

¹ФИЦ Институт катализа СО РАН, Новосибирск

²ФБГУН Институт неорганической химии СО РАН, Новосибирск

*potylicy@catalysis.ru

Углеродные нановолокна (УНВ) представляют собой наноразмерные нитевидные структуры, состоящие из слоёв графена, которые имеют форму конусов, чашечек или пластин, уложенных друг на друга. За несколько десятилетий ученые определили набор уникальных физико-химических свойств, присущих УНВ: большая удельная поверхность, инертность, хорошая электро- и теплопроводность. Сочетание таких характеристик обуславливает широкий выбор областей, где данные материалы могут применяться. Чаще всего внимание исследователей сосредоточено на создании композитных материалов с добавлением УНВ. Цель введения углеродных нановолокон в матрицы совершенно различной природы (резины, масла, полимеры, бетон и т.д.) заключается в улучшении или придании определенных свойств такому композиту. В данной работе углеродные нановолокна были получены в результате каталитического разложения трихлорэтилена (C_2HCl_3 , ТХЭ). Наличие хлора в молекуле субстрата определяет не только элементный состав получаемого продукта, но также его уникальное сегментированное строение. Периодический процесс хлорирования/дехлорирования поверхности катализатора обуславливает импульсный режим роста углеродных нитей с ярко выраженным сегментированным строением (Рисунок 1). Благодаря рыхлому характеру упаковки графита, полученные углеродные нановолокна характеризуются высокими текстурными показателями ($S_{уд}$ до $400 \text{ м}^2/\text{г}$ и $V_{пор}$ до $1 \text{ см}^3/\text{г}$). Стоит отметить, что сегментированные нити удалось получить при разложении ТХЭ на никеле и его сплавах Ni-Mo и Ni-W (Рисунок 1а). В то же время материал, синтезированный на Ni-Pd и Ni-Sn сплавах, обладает другой особенностью: длинные волокна субмикронного диаметра, растущие параллельно и создающие макроструктуру в виде «сетки» (Рисунок 1б). Вероятно, структурные особенности углеродных нитей в значительной степени определяются составом катализатора.

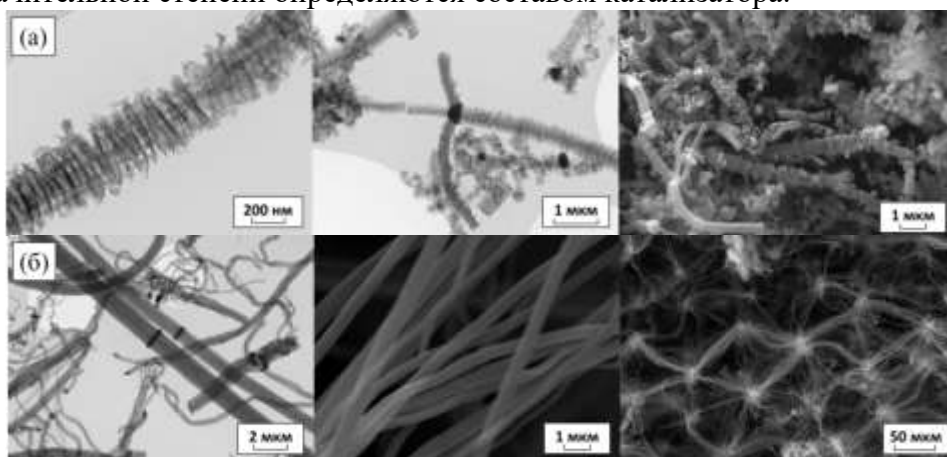


Рисунок 1. Снимки СЭМ и ПЭМ углеродных нановолокон, полученных разложением ТХЭ при 600°C а) на 96Ni-4W катализаторе; б) на 99.75Ni-0.25Sn катализаторе

В докладе будут обсуждены особенности формирования различных видов углеродных нановолокон, полученных пиролизом C_2HCl_3 на Ni-M катализаторах (M=Mo, W, Sn, Pd). Будут представлены результаты физико-химических методов анализа (ПЭМ, СЭМ) и текстурные характеристики углеродных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ №22-13-00406).

Антибактериальные полимерные пленки на основе пиллар[5]арена и Моксифлоксацина гидрохлорида

Александрова Ю.И.^{1,*}, Назмутдинова В.А.¹, Шурпик Д.Н.¹, Зеленихин П.В.², Стойков И.И.^{1,3}

¹Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский федеральный университет, Казань

²Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань

³Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань

*a.julia.1996@mail.ru

По данным ВОЗ в последнее десятилетие более половины всех бактериальных инфекций человека напрямую связаны с образованием биопленок патогенными микроорганизмами. При этом образование микробных биопленок оказывает негативные последствия и в материаловедении, ускоряя коррозию металлов и приводя в негодность медицинское оборудование. Используемые стратегии борьбы с патогенными биопленками имеют ряд общих недостатков: низкая эффективность, короткое время действия и развитие толерантности к антибиотику. Применение полимерных материалов и композиций, способных длительно ингибировать биопленкообразование, позволит устранить эти недостатки. Последние исследования показывают, что супрамолекулярные полимеры являются перспективными компонентами для антибактериальных материалов за счет новых «умных» функций, таких как саморегенерация, контролируемая адгезия микробных клеток, формирование систем гость-хозяин (макроцикл/антибиотик или антисептик).

В данной работе впервые были получены полимерные пленки, содержащие фрагменты пиллар[5]арена **1** (Рисунок 1), с использованием тиол/дисульфидной окислительно-восстановительной сшивки. Данные пленки были охарактеризованы комплексом физических методов: термогравиметрического анализа и дифференциально-сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии, электронной микроскопии. Полученные пленочные структуры продемонстрировали способность к самозаживлению под действием кислорода воздуха. Методами двумерной ¹H-¹H NOESY и DOSY ЯМР спектроскопии, электронной спектроскопии поглощения была показана способность пиллар[5]арена **1**, входящего в состав пленок, образовывать комплексы с антимикробным препаратом IV поколения – Моксифлоксацина гидрохлоридом состава 2:1 (lgK₁₂ = 6,20). Содержащие Моксифлоксацина гидрохлорид пленки на основе тиолированного пиллар[5]арена **1** эффективно подавляли развитие биопленок *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae* на адгезивных поверхностях слайд-камер.

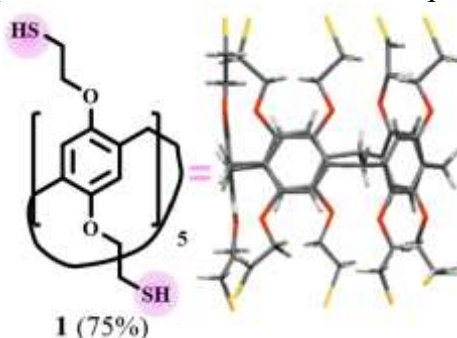


Рисунок 1. Структура макроцикла **1**, содержащего свободные меркаптогруппы

Таким образом, разработанные нами уникальные биоматериалы могут найти применение в качестве новых форм полимерных антибактериальных покрытий с функцией саморегенерации в медицинских учреждениях для улучшения санитарно-гигиенической обстановки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-73-10166.

Электронно-микроскопический портрет одноклеточного эукариота *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii*

Юхтанов Д.А.^{1,2,*}, Науменко Л.Г.¹, Мензоров А.Г.^{1,2}, Дорошков А.В.¹, Сульдина Л.А.¹,
Киселева Е.В.¹, Морозова К.Н.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*d.yukhtanov@g.nsu.ru

На сегодняшний день филогенетическое дерево эукариот состоит из множества супергрупп, одной из которых является Telonemia, Stramenophila, Alveolata, Rhizaria (TSAR). TSAR составляют до половины видового разнообразия всех эукариот и требуют более детального изучения внутри отдельных ветвей.

Кроме огромного разнообразия видов, TSAR имеют широкий спектр механизмов перехода между разными стадиями жизненного цикла: от характерного для многих простейших бинарного деления до уникальных, сложных механизмов, таких как шизогония. Большая часть исследований направлена на понимание клеточного деления у наиболее значимых с точки зрения здравоохранения видов (например, *Plasmodium falciparum*), в то время как для остальных организмов таких исследований мало.

Данная работа посвящена недавно открытому виду *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* – одному из представителей класса Labyrinthulomycetes, относящихся к группе Stramenophila. Проведенные ранее исследования ультраструктуры родственных видов не включали в себя реконструкцию изменения организации клеточных органелл на всех стадиях жизненного цикла. Таким образом цель нашей работы – разработка методов получения *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* на стадиях вегетативной клетки и зооспоры и электронно-микроскопический анализ этих стадий. Сочетание методов просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии позволяет получить трехмерное изображение высокого разрешения и детальную реконструкцию изменений органелл *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* на разных этапах жизненного цикла.

В результате был отработан метод получения зооспор и вегетативных клеток, а также получены первые электронно-микроскопические изображения вегетативных клеток *Thraustochytrium aureum ssp. strugatskii* с основными отличительными элементами класса Labyrinthulomycetes: эктоплазматическим ретикулумом, ботросомой, чешуйчатым наружным слоем, большим количеством липидных гранул.

Культивирование клеток выполнено на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН

(<https://ckp.icgen.ru/cells/>;
http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). Электронно-микроскопический анализ выполнен на микроскопе JEM1400 (Jeol, Япония) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0015.

Поиск новых антибиотиков и изучение их механизмов действия

Лукьянов Д.А.^{1,2,*}, Никандрова А.А.¹, Имамутдинова А.Н.^{1,2}, Волынкина И.А.¹, Кряквин М.А.³,
Остерман И.А.^{1,2}, Донцова О.А.^{1,2,4,5}, Сергиев П.В.^{1,2,4,6}

¹Сколковский институт науки и технологий, Сколково

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

³МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

⁴Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского,
Москва

⁵Институт биоорганической химии, Москва

⁶МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва

*d.lukianov@skoltech.ru

Пандемия коронавируса 2020-2023 года показала незащищенность человечества перед патогенами. Антибиотики были открыты в начале прошлого века, однако бактериальные заболевания по сей день являются одной из серьезнейших угроз для современного общества. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в 2020 году было задокументировано более 3 млн случаев заражения бактериальными инфекциями устойчивыми к антибиотическим препаратам, применяемым на практике. По сравнению с 2016 годом этот показатель вырос более чем вдвое. Таким образом задача поиска новых антибиотиков остро стоит перед современной наукой.

Для поиска новых антибиотиков были использованы гиперчувствительные к антибиотикам штаммы *E. coli* JW5503 с удаленным геном *tolC* ($\Delta tolC$) и *E. coli* *lptD* mut (*lptD*) трансформированные репортерной плазмидой pDualrep2. Репортерная система работает по следующему принципу (Рисунок 1): если соединение ингибирует синтез белка в клетке, это приводит к синтезу дальнекрасного флуоресцентного белка (Katushka2S). ДНК повреждающие соединения активируют SOS-ответ в клетке, что приводит к запуску экспрессии гена красного флуоресцентного белка (TurboRFP).

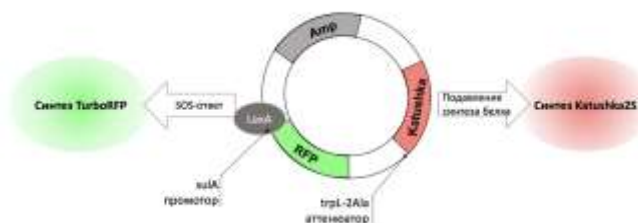


Рисунок 1. Принцип действия репортерной системы pDualrep2

В нашей лаборатории был произведен масштабный поиск веществ с антибиотической активностью при помощи репортерной системы pDualrep2. Было проверено более 60000 индивидуальных химических соединений из химических библиотек. В результате была обнаружена молекула индуцирующая трансляционную часть репортерной системы и ингибирующая биосинтез белка, формула этой молекулы 1-(2-оксо-2-((4-феноксифенил)амино)этил)-3-(*n*-толил)-6,7-дигидро-5Н-пирроло[1,2-*a*]имидазол-1-ий хлорид. В ходе скрининга природных объектов были найдены продуценты таких антибиотиков, как тетраценомицин X, алтиомицин, нибомицин и других. Далее были подобраны условия выделения этих антибиотиков. Для тетраценомицина было показано, что он ингибирует биосинтез белка, а не связывается с ДНК, как было ранее описано в литературе. Также была получена структура комплекса рибосомы с этим антибиотиком, что подтверждает правильность идентификации механизма действия данного соединения. Таким образом данная система показала свою эффективность как инструмент поиска новых соединений с антибиотической активностью и уточнения механизма действия уже известных соединений.

Данное исследование было профинансировано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1085).

Биологически активные полифенолы маакии амурской

Тарбеева Д.В.^{1,*}, Федореев С.А.¹, Крылова Н.В.², Иунихина О.В.², Бердышев Д.В.¹

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

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток

*tarbeeva1988@mail.ru

На основе полифенолов маакии амурской в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ ДВО РАН) разработан и зарегистрирован в РФ гепатопротекторный препарат Максар®. В состав его активной субстанции «Маакии амурской экстракт сухой» входят изофлавоноиды, мономерные и димерные стильбены.

В дополнение к известным стильбенам (резвератрол (2), пицетаннол (3), маакин (4), сцирпусин А (5), мааколин (7) и маакиазин (6)), из ядровой древесины маакии амурской мы выделили новый изофлаваностильбен маакиапицевеститол (1). Для установления его структуры были использованы методы одномерной (¹H и ¹³C) и двумерной (COSY, HSQC, HMBC, ROESY) спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии кругового дихроизма (КД). По данным ЯМР-спектроскопии молекула маакиапицевеститола (1) состояла из фрагментов веститола и пицетаннола. Анализ спектров ЯМР и проведенные теоретические расчеты с помощью нестационарной теории функционала плотности показали, что маакиапицевеститол (1) представлял собой смесь двух устойчивых конформеров 1a и 1b, конформационный переход между которыми затруднен из-за высокого энергетического барьера ($\Delta E \geq 20$ ккал/моль). Сравнение экспериментально полученных и теоретически рассчитанных констант спин-спинового взаимодействия и КД-спектров позволило определить конфигурацию их асимметрических центров при C-3 как R, а при C-4 как S.

Антигерпетическую активность полифенолов маакии амурской изучали с помощью анализа ингибирования цитопатогенного действия вируса. На ранней стадии вирусной инфекции полифенолы добавляли к клеткам Vero одновременно с вирусом герпеса первого типа (ВПГ-1). Стильбены 1, 3–5 проявляли значительную противовирусную активность (значения ИК₅₀ варьировали от 27 до 90 мкМ). Маакиазин (6) и мааколин (7) обладали умеренной активностью (ИК₅₀ 45,0 и 88,9 соответственно). ПФК маакии амурской также эффективно ингибировал репликацию вируса (значения ИК₅₀ и ИС составили 13,9 мкг/мл и 87 соответственно).

Активность полифенольных соединений из маакии амурской против ВПГ-1 также оценивали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Мы показали, что полифенольные соединения маакии амурской значительно ингибировали репликацию ВПГ-1 в концентрации 50 мкг/мл, когда клетки Vero одновременно обрабатывали этими соединениями и инфицировали ВПГ-1. В этой концентрации соединения 1, 3–5 и ПФК снижали количество циклов амплификации в среднем на 14 циклов (ΔCt) и полностью (до 100%) ингибировали репликацию вируса. Однако в концентрации 5 мкг/мл только соединения 1, 5 и ПФК снижали относительный уровень ДНК ВПГ-1 в среднем на 30% по отношению к вирусному контролю ($p < 0,05$).

Таким образом, полифенольные соединения маакии амурской ингибировали инфекцию ВПГ-1 дозозависимым образом. Мы обнаружили, что соединения 1, 3–5 и ПФК маакии амурской были наиболее эффективны при их добавлении одновременно с инфицированием клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 22-75-00084.

Взаимодействие CYP51 человека и азол-резистентных штаммов грибов рода *Candida* с природными и синтетическими стероидами

Цыбрук Т.В.^{1,*}, Калужский Л.А.³, Барановский А.В.¹, Иванчина Н.В.², Кича А.А.²,
Иванов А.С.³, Гилеп А.А.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

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

³ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

*tvshkel@gmail.com

Одной из приоритетных мишеней противогрибковой терапии является ключевой фермент биосинтеза эргостерола – CYP51, относящийся к суперсемейству цитохромов P450. Развитие устойчивости к существующим противогрибковым препаратам, в частности к азолам, а также способность азолов взаимодействовать со многими цитохромами P450 человека приводит к необходимости поиска новых эффективных лекарственных веществ, обладающих высокой специфичностью в отношении действия на резистентные штаммы грибов. В качестве потенциальных ингибиторов могут рассматриваться аналоги субстратов CYP51 стероидной природы.

На базе ТИБОХ ДВО РАН из морских организмов класса Asteroidea были выделены производные стероидов, которые обладают разной физиологической активностью [1]. В ИБОХ НАН Беларуси были синтезированы структурные аналоги стероидных 17-изоксазолов и изоксазолинов. Нами были клонированы из клинических образцов и получены в высокоочищенном виде препараты CYP51 азолрезистентных штаммов грибов *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. krusei*.

С использованием метода спектрофотометрического титрования нами были проведены исследования по изучению взаимодействия CYP51 человека и азол-резистентных штаммов грибов *C. albicans* и *C. glabrata* с производными стероидов животного происхождения [2], а также синтезированными 17-изоксазолилстероидами и их производными как потенциальными и селективными ингибиторами CYP51 [3].

В результате изучения взаимодействия CYP51 человека и грибов с природными и синтетическими стероидами обнаружены соединения, специфичные к CYP51 человека, а также соединения, которые селективно и с высоким сродством взаимодействуют с CYP51 резистентных штаммов грибов (для большинства соединений значения K_d находятся на микромолярном уровне). Благодаря избирательному действию на CYP51 различных организмов, данные лиганды могут быть использованы для создания селективных ингибиторов CYP51 человека (мишени для антихолестеринемических и подавляющих сперматогенез препаратов) и разработки противогрибковых средств нового поколения, эффективных против азолрезистентных штаммов патогенных грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ № X23РНФ-090 и гранта РФФИ № 23-44-10009.

Ссылки:

1. Ivanchina, N.V.; Kicha, A.A.; Stonik, V.A. Steroid Glycosides from Marine Organisms. *Steroids* **2011**, *76*, 425–454.
2. Kaluzhskiy, L.A., et al. Structural Analogues of Lanosterol from Marine Organisms of the Class Asteroidea as Potential Inhibitors of Human and *Candida albicans* Lanosterol 14 α -demethylases. *Natural Product Communications* **2017**, *12*, 1843–1846.
3. Baranovsky, A., et al. Transformations, NMR Studies and Biological Testing of Some 17 β -Isoxazolyl Steroids and Their Heterocyclic Ring Cleavage Derivatives. *Steroids* **2021**, *166*, 1–6.

Влияние нокаута гена *Tnf* на поведение, экспрессию BDNF и серотониновую систему мозга при хроническом введении дексаметазона

Скотникова А.К.^{1,*}, Адонина С.Н.², Москалюк В.С.², Куликова Е.А.², Базовкина Д.В.²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*a.skotnikova@g.nsu.ru

Провоспалительный цитокин фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) – один из ключевых посредников между иммунной и центральной нервной системой. TNF вовлечен в регуляцию поведения, нейротрофического обеспечения мозга, в частности, уровня BDNF (нейротрофического фактора мозга), и работу серотониновой системы мозга. В свою очередь, к изменениям уровня BDNF в мозге и нарушениям поведения может приводить хроническое введение синтетического глюкокортикоида дексаметазона.

Целью данной работы было исследование влияния полного нокаута гена *Tnf* на чувствительность мышей к длительному введению дексаметазона. Эксперименты проводили на половозрелых мышах с нокаутом гена *Tnf* (TNF KO) и мышах инбредной линии C57BL/6 (WT). Среди животных каждой линии 10 получали инъекции дексаметазона, другие 10 – инъекции физиологического раствора. Уровень экспрессии генов, кодирующих BDNF, его рецепторы и компоненты серотониновой системы в структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп, средний мозг) оценивали методом ОТ-ПЦР реального времени. Уровни белков BDNF и proBDNF оценивали методом Вестерн-блот анализа, а уровни 5-НТ и его метаболита 5-НИАА в структурах мозга исследовали методом ВЭЖХ.

Статистический анализ выявил снижение двигательной активности в тесте «Открытое поле» ($p < 0,05$), усиление депрессивно-подобного замирания в тесте «Подвешивание за хвост» ($p < 0,05$) и усиление тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» ($p < 0,05$) у мышей линии TNF KO в отличие от мышей WT при длительном введении дексаметазона. Напротив, ухудшение когнитивных способностей в тесте «Новый объект» наблюдали только у мышей WT ($p < 0,05$). В гиппокампе у мышей линии TNF KO было выявлено увеличение экспрессии гена *Bdnf* на уровне мРНК ($p < 0,05$) и увеличение уровня содержания белка proBDNF на уровне тенденции ($p=0,061$), в префронтальной коре увеличение уровня содержания белка proBDNF сильнее было выражено у мышей TNF KO ($p < 0,05$ для WT и $p < 0,001$ для TNF KO). Дексаметазон привел к увеличению соотношения 5-НИАА/5-НТ в префронтальной коре на уровне тенденции ($p=0,06$) и снижению экспрессии гена, кодирующего 5-НТ7 рецептор ($p < 0,05$), в среднем мозге животных линии TNF KO.

Полученные данные позволяют расширить представление о влиянии иммунной системы на нейротрофическое обеспечение и работу серотониновой системы мозга.

ЯМР-метабомика в биомедицинских исследованиях

Марьясина С.С.^{*}, Айсин К.Н., Сергиев П.В., Польшаков В.И.
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
^{*}sofia.mariasina@yandex.ru

Метаболом — совокупность метаболитов, то есть низкомолекулярных веществ, принимающих участие в химических реакциях, протекающих в клетке, органе или целом организме. Метаболом характеризует состояние живой системы в конкретный момент времени, поэтому позволяет делать выводы о состоянии организма, в том числе — об имеющихся в нём патологиях и протекающих заболеваниях.

Эксперимент по метабомике включает три этапа: пробоподготовку, измерения и анализ (Рисунок 1). Способ пробоподготовки определяется типом изучаемого объекта (необходимость измельчения или удаления белков и липидов).

Второй этап — проведение измерений. Для определения низкопредставленных метаболитов преимущественно используют хроматографические методы в сочетании с масс-спектрометрией, обеспечивающие высокую чувствительность, но имеющие низкую воспроизводимость и отличающиеся сложностью и дороговизной пробоподготовки. С другой стороны, для анализа более представленных метаболитов используют спектроскопию ЯМР. Этот метод отличается высокой воспроизводимостью и простотой пробоподготовки.

На третьем этапе проводят анализ полученных экспериментальных данных с целью получения конкретной биологической модели, отвечающей на вопросы исследования.

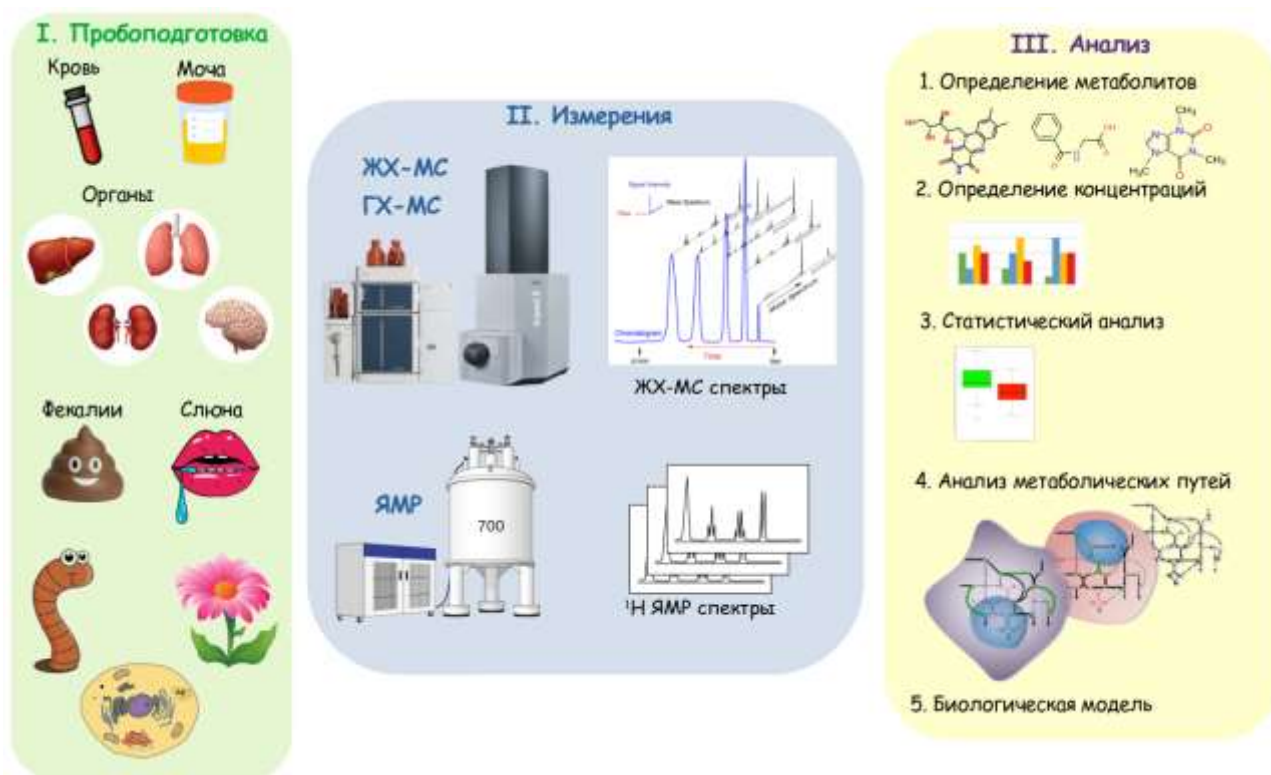


Рисунок 1. Общая схема эксперимента по метабомике

В настоящем докладе представлены результаты изучения метаболома человека и животных методом спектроскопии ЯМР для решения широкого круга биологических задач.

Работа выполнена при поддержке РФФ 19-14-00115.

Современные и перспективные подходы к ингибированию вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1

Спирин П.В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Москва

*discipline82@mail.ru

На конец 2021 года в мире проживало около 38,4 миллиона ВИЧ-инфицированных людей. Российская Федерация, по данным ряда отчётов международных организаций, занимающихся учётом случаев ВИЧ-1, в 2022 году входит в пятерку стран с самой высокой скоростью распространения ВИЧ-инфекции. С момента открытия вируса проведено значительное число исследований с целью разработки препаратов против ВИЧ-1, но до сих пор не существует ни одного терапевтического средства, способного полностью избавить пациента от ВИЧ. Современные тактики лечения ВИЧ-инфицированных подразумевают использование низкомолекулярных соединений, нацеленных на ферменты вируса, такие как протеаза, интегразы и обратная транскриптаза (ревертаза) и позволяют в значительном числе случаев добиться существенного улучшения качества жизни пациентов и значительно замедлить развитие синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД). Однако, несмотря на существующие успехи в терапии ВИЧ-1, крайне актуальным остаётся поиск новых стратегий к борьбе с данным заболеванием. К числу таких можно отнести применение оригинальных препаратов, блокирующих первичный контакт вируса с клеткой, разработку форм препаратов, обеспечивающих пролонгированный противовирусный эффект, поиск новых эффективных комбинаций известных препаратов, обладающих выраженным противовирусным действием. Исследования поддержаны грантом Российского Научного Фонда № 21-14-00355.

Лиганд-связывающие характеристики CYP51B1 *Mycobacterium tuberculosis* в отношении производных стероидов из морских организмов

Карпуть Е.Ю.^{1,*}, Капустина И.И.², Табакмахер К.Н.², Макарьева Т.Н.², Кича А.А.²,
Иванчина Н.В.², Дмитренко П.С.², Калужский Л.А.³, Гилеп А.А.¹

¹Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск

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

³ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

*alena.karputs@gmail.com

Стероид-14 α -деметилазы CYP51 — представители крупного суперсемейства ферментов цитохромов P450, обнаруженные во всех царствах живых организмов и катализирующие реакцию 14 α -деметилирования ряда природных стероидов, включая ланостерин, обтузифолиол и 24,25-дигидроланостерин. CYP51 являются важными компонентами цепи биосинтеза стероидов у эукариот и по этой причине представляют одну из основных мишеней противогрибковой терапии.

Ген, гомологичный стероид-14 α -деметилазе CYP51B1B, был также обнаружен в геноме *Mycobacterium tuberculosis*. Исследование лиганд-связывающих свойств показало, что CYP51B1 *M. tuberculosis*, помимо вышеперечисленных стероидов, способен связывать эстриол, эстрадиол, прогестерон и андростерон [1]. При этом у *M. tuberculosis* отсутствует путь биосинтеза стероидов, и ни одна из этих молекул не является его природным субстратом, однако установлено, что некоторые микобактериальные цитохромы P450 участвуют в метаболизме ряда иммуноактивных стероидов человека [2]. Этот факт, а также консервативность CYP51B1 среди представителей рода *Mycobacterium* и локализация в геноме рядом с ферредоксином Rv0763c, который поддерживает его каталитическую активность *in vitro*, могут косвенно указывать на участие CYP51B1 в важном для микобактерий биохимическом процессе, например, в модификации экзогенных стероидных молекул организма-хозяина микобактерий.

Нами был получен высокоочищенный белковый препарат CYP51B1 *M. tuberculosis*, с помощью метода спектрофотометрического титрования были проведены исследования взаимодействия CYP51B1 со стероидами из морских организмов, полученных на базе ТИБОХ ДВО РАН, представляющих собой широкий набор эволюционно древних изопреноидов. Проведенные исследования позволяют предположить биологическую роль CYP51B1 для патогенных микобактерий.

В докладе также будет представлена информация о функциональных особенностях и лиганд-связывающих свойствах других микобактериальных цитохромов P450.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ № X23РНФ-090 и гранта РФФИ № 23-44-10009.

Ссылки:

1. Mohamed, H. et al. A comparison of the bacterial CYP51 cytochrome P450 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis* **2022**, 221, 1060–1097.
2. Varaksa, T. et al. Metabolic fate of human immunoactive sterols in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology* **2021**, 433, 1–16.

Крабоподобные искусственные рибонуклеазы для селективного ингибирования онкогенных миРНК

Чиглинцева Д.А.^{1,*}, Патутина О.А.¹, Хейман Т.², Сенькова А.В.¹, Гапонова С.К.¹, Власов В.В.¹, Биченкова Е.В.², Зенкова М.А.¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Университет Манчестера, Манчестер

*dashachiglintseva@gmail.com

В последние десятилетия появляется все больше данных о том, что в качестве терапевтических мишеней могут выступать малые некодирующие молекулы РНК - микроРНК (миРНК), играющие важную роль в регуляции ключевых биологических процессов в клетке. Нарушение экспрессии миРНК ассоциировано со многими патологическими процессами, включая онкологические заболевания. Перспективной стратегией снижения высокого уровня онкогенных миРНК и, как следствие, подавления процессов канцерогенеза является применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Ранее нашей научной группой были разработаны различные структурные варианты миРНК-направленных иРНКаз, которые позволяли эффективно расщеплять миРНК-мишень в 3'-области [1] и в центральной части молекулы [2,3].

В данной работе были сконструированы иРНКазы нового дизайна - крабоподобные миРНКазы, состоящие из олигонуклеотида, комплементарного центральной части миРНК-мишени, и двух каталитических пептидов, присоединенных по 5'- и 3'-концам адресующей компоненты. Уникальность разработанных нуклеаз заключается в их способности расщеплять миРНК в «5'-затравочной» и «3'-компенсаторной» областях молекулы, имеющих решающее значение для специфичности и функционирования миРНК. Исследование рибонуклеазной активности показало, что разработанные иРНКазы способны расщеплять миРНК в истинном каталитическом режиме. Более того, гетеродуплекс миРНК/конъюгат распознается РНКазой Н, способствуя многократному увеличению скорости деградации миРНК-мишени. Исследование биологических свойств разработанных конструкций показало, что крабоподобные иРНКазы, направленные к онкогенным миРНК-21 и миРНК-17, снижают уровень миРНК-мишеней в клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 до 50% и, как следствие, оказывают антипролиферативное и проапоптотическое действие. Исследование противоопухолевого потенциала крабоподобных соединений *ex vivo* показало, что трансфекция иРНКазами опухолевых клеток MCF-7 с последующей трансплантацией мышам линии nude снижает объем опухоли в 3 раза. Таким образом, разработанные ингибиторы миРНК могут являться перспективными терапевтическими агентами для лечения онкологических и других миРНК-ассоциированных заболеваний.

Работа поддержана грантом РФ № 19-14-00250.

Ссылки:

1. Patutina, O.A.; Bichenkova, E. V.; Miroshnichenko, S.K.; Mironova, N.L.; Trivoluzzi, L.T.; Burusco, K.K.; Bryce, R.A.; Vlassov, V. V.; Zenkova, M.A. MiRNases: Novel Peptide-Oligonucleotide Bioconjugates That Silence MiR-21 in Lymphosarcoma Cells. *Biomaterials* **2017**, *122*, 163–178.
2. Patutina, O.; Chiglintseva, D.; Bichenkova, E.; Gaponova, S.; Mironova, N.; Vlassov, V.; Zenkova, M. Dual MiRNases for Triple Incision of MiRNA Target: Design Concept and Catalytic Performance. *Molecules* **2020**, *25*, 1–23.
3. Patutina, O.; Chiglintseva, D.; Amirloo, B.; Clarke, D.; Gaponova, S.; Vlassov, V.; Bichenkova, E.; Zenkova, M. Bulge-Forming MiRNases Cleave Oncogenic MiRNAs at the Central Loop Region in a Sequence-Specific Manner. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6562.

Перспективы совместного применения холодной плазмы и наночастиц золота в противоопухолевой терапии

Бирюков М.М.^{1,2,3,*}, Полякова А.А.^{1,2,3}, Крячкова Н.В.^{1,2,3}, Горбунова Е.А.^{1,2,3}, Милахина Е.В.³,
Закревский Д.Э.³, Швейгерт И.В.³, Коваль О.А.^{1,2,3}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

³*Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН,
Новосибирск*

*biryukov.mm@ya.ru

Холодная плазма (ХП) – это частично ионизированный газ, в потоке которого образуются активные формы кислорода и азота (АФКА) – молекулы, ионы и радикалы с высокой реакционной способностью. АФКА способны оказывать широкий спектр биологических эффектов, приводя к ускорению процессов регенерации тканей в малых дозах и к гибели клеток в высоких дозах. Из-за своего цитотоксического и цитостатического эффекта ХП рассматривается как перспективный подход для борьбы с онкологическими заболеваниями, особенно в комбинации с другими противоопухолевыми средствами, например, с препаратами химиотерапии, ингибиторами ферментов, антителами, малыми интерферирующими РНК, а также с наноматериалами. Наночастицы золота (НЧЗ) являются одним из наиболее изученных объектов среди наноматериалов. Воспроизводимые методики синтеза позволяют получать монодисперсные частицы разных размеров, а также ковалентно присоединять к поверхности частиц молекулы практически любой природы. НЧЗ могут быть использованы как для терапевтических целей при конъюгации с молекулами лекарственных средств, так и в качестве инструментов для исследования.

Целью данной работы было изучение влияния наночастиц золота на цитотоксичность холодной плазмы в отношении опухолевых клеток, а также исследование динамики проникновения наночастиц в клетки. В работе использовали генератор холодной плазмы, разработанный в Институте физики полупроводников СО РАН. НЧЗ диаметром 6 и 13 нм без покрытия, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), а также конъюгированные с изотиоционатом флуоресцеина (FITC) были синтезированы в Лаборатории структурной биологии ИХБФМ СО РАН. Биологические эффекты холодной плазмы и НЧЗ изучали на культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549.

Было показано усиление цитотоксического эффекта холодной плазмы, работающей в импульсном режиме иницирующего напряжения, при использовании НЧЗ с диаметром 13 нм, покрытых ПЭГ, в концентрации 20 пМ. Для оценки доли клеток, захвативших НЧЗ, были использованы наночастицы, конъюгированные с FITC. Проникновение конъюгатов оценивали, добавляя НЧЗ-ПЭГ-FITC сразу, через 0,5-4 ч после обработки клеток ХП, с последующим анализом флуоресценции клеток проточной цитометрией. В среднем 20-30% клеток содержали НЧЗ-ПЭГ-FITC при добавлении к клеткам через 0-3 ч после обработки ХП. Интенсивность захвата клетками НЧЗ увеличивалась в течение первого часа. Таким образом, наночастицы золота способны под действием холодной плазмы проникать в клетки и усиливать ее цитотоксичность. НЧЗ-ПЭГ в комбинации с холодной плазмой можно использовать для доставки в клетки терапевтически значимых молекул.

Работа поддержана грантом РФ № 22-49-08003.

Направленная эволюция антитела против вируса клещевого энцефалита для переключения его специфичности

Михайлова Е.Е.^{1,2,*}, Байков И.К.^{1,2}, Тикунова Н.В.^{1,2}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*kotiyar7@yandex.ru

Вирус клещевого энцефалита передается человеку через укусы инфицированными иксодовыми клещами, а результатом развития инфекционного заболевания становится поражение центральной нервной системы. На данный момент выделяют три основных субтипа вируса клещевого энцефалита – дальневосточный, сибирский и европейский. В основе одного из перспективных направлений для противовирусной терапии этого заболевания лежит создание вируснейтрализующих рекомбинантных антител. В качестве способа экстренной профилактики и метода лечения в случае возникновения вирусной инфекции часто используют препараты на основе иммуноглобулинов, полученных из сыворотки крови иммунизированных доноров. Однако, в сравнении с ними, рекомбинантные антитела имеют ряд преимуществ. В частности, например, их производство не подразумевает контакт с донорской кровью, а использование препаратов рекомбинантных антител несет значительно меньшие риски.

Ранее в лаборатории молекулярной микробиологии ИХФБМ СО РАН на основе вариабельных доменов протективного моноклонального мышинового антитела 14D5 было получено одноцепочечное антитело sc14D5, направленное на домен III гликопротеина E вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). Было показано, что при довольно высокой аффинности ($KD \sim 2 \times 10^{-9}$ нМ) к домену III гликопротеина E дальневосточного субтипа вируса, антитело sc14D5 проявляет на 1-2 порядка более низкое сродство к европейскому и сибирскому вариантам рекомбинантного домена III. Это обуславливается различиями вирусных белков в области эпитопа.

Для того, чтобы повысить сродство антитела sc14D5 к европейскому варианту домена III ВКЭ, был выбран метод направленной эволюции этого антитела. Исследование включало в себя несколько этапов – получение разнообразия вариантов антител, несущих мутации, отбор наиболее аффинных представителей и их последующий анализ. Разнообразие вариантов получали с помощью случайного мутагенеза исходного гена, а в качестве метода селекции использовали фаговый дисплей. В результате удалось отобрать два варианта антител с повышенным сродством к домену III европейского субтипа в сравнении с исходным вариантом антитела. Было показано, что отобранные антитела обладают более высокой аффинностью не только к европейскому варианту, к которому проводили отбор, но и к сибирскому варианту домена III. Структурный анализ возникших замен помог объяснить, за счет чего эти мутации увеличивают сродство к целевым белкам. Таким образом, с помощью методов направленной эволюции удалось повысить сродство антитела sc14D5 к европейскому и сибирскому вариантам домена III гликопротеина E ВКЭ.

Взаимодействие ибупрофена с липидной мембраной и наноструктура его пространственного распределения в ней

Кашник А.С.* , Баранов Д.С., Дзюба С.А.

Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск

*anna.smor.mr@gmail.com

В данной работе изучается наноразмерное пространственное распределение нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) ибупрофена в модельных биологических мембранах. По оценкам экспертов, ибупрофен является наиболее часто назначаемым НПВП в клинической практике. Однако, несмотря на его широкую распространенность, ибупрофен обладает рядом побочных эффектов, таких как: тошнота, рвота и желудочный дискомфорт. Изучение взаимодействий лекарственных средств с мембранами имеет большое прикладное значение, так как способствует оптимизации дизайна лекарств, способов их доставки и усвоения клетками, тем самым помогая минимизировать возможные побочные эффекты. В связи с этим новые данные о процессах взаимодействия НПВП с липидными мембранами, ранее недоступные для обнаружения и описания, могли бы оказаться чрезвычайно полезными. Спектроскопия электрон-электронного двойного резонанса (Pulsed Electron-Electron Double Resonance или сокращенно PELDOR) на основе данных о диполь - дипольных взаимодействиях позволяет определять расстояния между спиновыми метками и исследовать пространственное распределение радикалов. До сих пор спектроскопия PELDOR применялась в основном к биомолекулам с двойной спиновой меткой для изучения их конформации. Недавно было показано, что PELDOR может применяться к мономеченым молекулам и выявлять особенности их наноразмерного пространственного распределения.

Здесь PELDOR был применен для изучения (моно) спин-меченого ибупрофена в бислое пальмитоилолеил-фосфатидилхолин (POPC). Полученные результаты показывают, что молекулы спин-меченого ибупрофена расположены в пределах одной плоскости в каждом двухслойном листке. При их низкой молярной концентрации в бислое χ обнаруженная поверхностная концентрация спин-меченого ибупрофена в два раза выше, чем χ , что можно объяснить альтернативной сборкой в каждом листке бислоя по типу «шахматной шкатулки». При $\chi > 2$ мол. % эти ансамбли сливаются [1]. С помощью метода модуляции огибающей электронного спинового эха (ESEEM) было обнаружено, что спиновая метка погружена внутрь гидрофобного бислоя [2]. Полученные данные проливают новый свет на наноразмерное пространственное расположение ибупрофена в биологических мембранах.

Исследование было поддержано Российским научным фондом, проект № 21-13-00025.

Ссылки:

1. Kashnik A.S.; Baranov D.S.; Dzuba S.A. Ibuprofen in a Lipid Bilayer: Nanoscale Spatial Arrangement. *Membranes* **2022**, *12*, 1077.
2. Baranov D. S.; Smorygina A. S.; Dzuba S. A. Synthesis of spin-labeled ibuprofen and its interaction with lipid membranes. *Molecules* **2022**, *27*, 4127.

Электрокаталитические цитохром P450-системы: биосенсоры и биореакторы

Королёва П.И.^{*}, Шумянцева В.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

^{*}polinakoroleva1996@gmail.com

Цитохромы P450 (P450) – обширный класс гемопротеинов, относящихся к классу ферментов оксидоредуктаз, и участвующих в первой фазе биотрансформации ксенобиотиков. P450 также участвуют в биотрансформации стероидных гормонов, жирных кислот и других эндогенных соединений. Разнообразие субстратов и типов реакций, катализируемых P450 делает их перспективными для создания биокатализаторов. Электрохимические системы позволяют исследовать каталитические свойства цитохромов P450 в режиме биосенсоров и биореакторов, исключая необходимость в воссоздании сложной электрон-транспортной цепи, состоящей из нескольких белков редокс-партнеров цитохрома P450, поскольку электроны в электрохимических системах поступают с электрода непосредственно на активный центр фермента. Кроме того, использование графитовых электродов, производимых методом трафаретной печати («печатные электроды») обеспечивает взаимозаменяемость и миниатюризацию определения каталитической активности фермента. Биохимические процессы в клетке протекают в высоко концентрированной среде, содержащей белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и низкомолекулярные соединения. Моделирование клеточного окружения цитохрома P450 может быть реализовано за счет помещения белка в ограниченное пространство, моделирующее молекулярный краудинг, для этого могут быть использованы краудинг-реагенты, или материалы, содержащие нанопоры.

Разработан метод иммобилизации цитохрома P450 3A4 на печатном графитовом электроде (ПГЭ), модификация которого позволяет создать ограниченное пространство для иммобилизации, сходное по свойствам с окружением цитохрома P450 в клетке. Для этого было использовано липидоподобное вещество дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ), образующее на поверхности электрода пленку, схожую по структуре с биологическими мембранами, а также мембранный белок стрептолизин O (SLO). Для исследования эффективности повышения электрокатализа была исследована система с цитохромом P450 3A4 и его субстратом, макролидным антибиотиком эритромицином, участвующим в реакции цитохром P450 3A4-зависимого N-деметилирования. Использование данного подхода позволило повысить эффективность электрокатализа цитохрома P450 3A4 в реакции N-деметилирования эритромицина в 3 раза ($100 \pm 22\%$ для системы ПГЭ/ДДАБ/СУР3A4 и $297 \pm 7\%$ для системы ПГЭ/ДДАБ/SLO/СУР3A4), а также увеличить скорость ферментативной реакции ($V_{\max} = 1,52 \pm 0,34 \times 10^{-10}$ М/мин и $V_{\max} = 4,52 \pm 0,33 \times 10^{-10}$ М/мин) соответственно.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021 - 2030 годы (№122030100168-2).

Ссылки:

1. Shumyantseva V.V.; Koroleva P.I.; Bulko T.V.; Shkel T.V.; Gilep A.A.; Veselovsky A.V. Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*. **2023**, *149*, 108277.
2. Шумянцева В.В.; Королева П.И.; Гилеп А.А.; Напольский К.С.; Иванов Ю.Д.; Канашенко С.Л.; Арчаков А.И. повышение эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. **2022**, *506*, 62-67.

Изучение вклада BDNF в ассоциативное обучение мышей с аутистически-подобным поведением

Щербакова А.И.^{1,*}, Цыбко А.С.^{1,2}, Хоцкий Н.В.², Науменко В.С.²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*a.shsherbakova2@g.nsu.ru

Расстройство аутистического спектра (РАС) – нейроонтогенетическое заболевание, которое в настоящее время считается серьезной проблемой из-за растущей распространенности во всем мире. Нарушение регуляции экспрессии BDNF (brain-derived neurotrophic factor) и передачи сигналов, которое приводит к изменениям в созревании нейронов и нейропластичности, является признаком таких нарушений развития нервной системы как РАС и СДВГ. Считается, что нарушения в работе нейронов при РАС являются результатом чрезмерной или сниженной поддержки BDNF.

В данной работе мы в течение трех дней проводили обучение мышей линии BTBR с аутистически-подобным поведением и мышей социально-нормальной линии C57Bl/6 в тесте “Оперантная стенка” в условиях домашней клетки с помощью установки PhenoMaster. С помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени оценили уровень мРНК различных транскриптов *Bdnf* и рецепторов к нему (*Ngfr*, *Ntrk2*), анализом вестерн-блот оценили уровень белков proBDNF, BDNF, p75^{NTR}, pTrkB, TrkB в среднем мозге, фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе исследуемых линий мышей.

Обучение мышей двух линий не показало в первый, ознакомительный день различий в заинтересованности животных по отношению к самой оперантной стенке и вознаграждению. Однако, с усложнением задачи в последующие дни эксперимента, было показано, что мыши линии BTBR неспособны усваивать учебные задачи и переключаться между ними, что выразилось в существенном снижении количества получаемого пищевого вознаграждения.

На молекулярном уровне показано, что экспрессия транскриптов *Bdnf* под промоторами I, II, III, IV снижена у мышей линии BTBR в гиппокампе, экспрессия под III промотором повышена у мышей BTBR в среднем мозге. После обучения уровень экспрессии I экзона *Bdnf* повышается в стриатуме и фронтальной коре у обеих линий мышей. У мышей с аутистически-подобным поведением экспрессия II экзона *Bdnf* снижается после обучения во фронтальной коре, VI экзона – снижается в гиппокампе, III – повышается в стриатуме, а V – повышается в среднем мозге. Экспрессия *Ntrk2* на базовом уровне повышена у BTBR в стриатуме, а в среднем мозге у BTBR экспрессия данного гена снижается после обучения.

Анализ уровней белков показал, что соотношение pro-формы к зрелой форме BDNF у мышей BTBR нарушено в стриатуме и фронтальной коре: доля proBDNF повышена. Соотношение фосфорилированной формы TrkB к нефосфорилированной повышено у мышей BTBR на базовом уровне, но после обучения снижается во фронтальной коре.

Таким образом, нами показано, что мыши линии BTBR с аутистически-подобным поведением имеют выраженные нарушения в способности к ассоциативному обучению. Данные нарушения могут быть напрямую связаны с дисрегуляцией экспрессии BDNF и его рецепторов. Кроме того, нами впервые показано, что у животных с аутистически-подобным фенотипом изменения в экспрессии гена *Bdnf* наблюдаются на уровне отдельных экзонов. Это позволяет рассматривать отдельные изоформы BDNF в качестве потенциальных мишеней для будущей терапии.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00028.

Хронический стресс изменяет чувствительность к глюкокортикоидам: вовлечение генов синтеза кортикостерона и ферментов энергетического метаболизма

Кисаретова П.Э.^{1,2,*}, Найданова М.А.^{1,2}, Салман Р.^{1,2}, Бондарь Н.П.^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

*p.kisaretova@g.nsu.ru

Нарушение отрицательной обратной связи ГГНС было показано у пациентов с большим депрессивным расстройством и на животных моделях депрессии. В данной работе мы использовали модель хронического стресса социальных поражений (ХССП) на самцах мышей линии C57Bl/6, которая приводит к депрессивно-подобному состоянию. Мы исследовали влияние высоких доз синтетического глюкокортикоида (ГК) дексаметазона (2 мкг/г) на динамику (2, 4 и 6 часов после введения) экспрессии ключевых генов, отвечающих за регуляцию выброса ГК в гипоталамусе и синтез ГК в надпочечниках (НП) методом qPCR. Кроме того, через 6 часов после введения дексаметазона мы оценили влияние на транскриптом префронтальной коры (ПФК), структуры, модулирующей реакцию на стресс и участвующей в проявлении симптомов депрессии.

Мы нашли, что развитие депрессивно-подобного состояния сопровождается изменением регуляции синтеза ГК в НП, но не в гипоталамусе. В НП депрессивных животных не было выявлено влияние дексаметазона на экспрессию ферментов синтеза ГК (*Cyp11a1*, *Cyp11b1*), которое было показано в контроле, что говорит о резистентности к повышенному глюкокортикоидному сигналу у животных с опытом хронического стресса.

При анализе динамики экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (ГР, *Nr3c1*) в гипоталамусе и ПФК в группе ХССП мы наблюдали более медленное возвращение уровня мРНК ГР к базальному после введения дексаметазона и нарушение циркадной осцилляции уровня экспрессии этого гена по сравнению с контрольной группой. Более того, мы обнаружили, что опыт хронического стресса приводил к появлению чувствительности к дексаметазону в ПФК ключевых генов циркадных ритмов *Per1* и *Arntl*.

Известно, что циркадным осцилляциям подчиняются гены, задействованные в продукции энергии в клетке. При анализе транскриптома ПФК мы обнаружили, что после хронического стресса экспрессия множества генов, участвующих в энергетическом метаболизме, изменялась в ответ на введение дексаметазона, тогда как в контроле изменения их экспрессии не наблюдалось. Это гены, участвующие в транспорте (*Slc2a1*, *Slc2a5*) и метаболизме глюкозы (*Pgm1*, *Eno2*, *Pkm*, *Hkdc1*), NAD⁺ (*Nmnat2*, *Naprt*, *Pnp*, *Aox1*, *Sirt2*), сфинголипидов (*Cers6*, *Cers4*, *Plpp3*, *Hexa*, *Sphk2*, *Sgpl1*) и липидных капель (*Dgat1*, *Dgat2*, *Plin2*).

Таким образом, мы показали, что хронический стресс приводит к появлению резистентности к ГК на уровне надпочечников и нарушению циркадной осцилляции экспрессии ГР в гипоталамусе и ПФК. В ПФК хронический стресс приводит к повышению чувствительности к ГК генов, продукты которых задействованы в метаболизме NAD⁺, глюкозы и липидов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-15-00142.

Полиморфизм С1473G в гене *Trh2* модифицирует реакцию мышей на острое введение ЛПС

Комлева П.Д.^{*}, Изъюров А.Е., Арефьева А.Б., Хоцкина А.С., Хоцкин Н.В., Куликов А.В.

ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск

^{*}polina.komleva@gmail.com

Серотониновая (5-НТ) система мозга вовлечена в регуляцию многих физиологических функций и видов поведения. В мозге млекопитающих 5-НТ синтезируется из аминокислоты L-триптофана. Ключевой стадией является гидроксирование L-триптофана до 5-гидрокситриптофана, катализируемое ферментом триптофангидроксилазой 2 (ТПГ2). Активность ТПГ2 определяет уровень 5-НТ в мозге. Полиморфизм С1473G в гене *Trh2*, приводящий к замене Р447R в молекуле ТПГ2, вдвое снижает активность фермента в мозге мышей. Несмотря на то, что данный полиморфизм не влияет на поведение и физиологические функции мышей, в природе ведется естественный отбор против аллели 1473G, снижающей активность ТПГ2. Физиологический механизм, связывающий активность ТПГ2 с адаптацией не ясен.

Целью было изучение связи полиморфизма С1473G с устойчивостью мышей к инфекциям в ювенильном возрасте. Для этого было проведено два эксперимента на молодых (3 недели) самцах мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, различающихся только по аллелям 1473С и 1473G с нормальной и низкой активностями ТПГ2. Инфекцию моделировали однократным в/б введением бактериального липополисахарида (ЛПС, 2 мг/кг). В эксперименте 1 было 4 группы мышей: В6-1473С физиологический раствор (n=8), В6-1473С ЛПС (n=8), В6-1473G физиологический раствор (n=8), В6-1473G ЛПС (n=12). Через 3 суток умерло 5 из 12 самцов В6-1473G, которым вводили ЛПС ($p < 0,05$). В то же время, введение ЛПС не привело к гибели ни одного самца В6-1473С. Для того, чтобы выяснить связь повышенной чувствительности мышей В6-1473G к ЛПС, был проведен эксперимент 2, в котором было также 4 группы мышей: В6-1473С физиологический раствор (n=9), В6-1473С ЛПС (n=8), В6-1473G физиологический раствор (n=8), В6-1473G ЛПС (n=8). Спустя 48 ч после введения у животных определяли концентрации 5-НТ, 5-Н1АА и активность ТПГ2 в среднем мозге, гипоталамусе и гиппокампе.

Получены следующие результаты. Как и ожидалось, активность ТПГ2 у мышей В6-1473G была ниже, чем у В6-1473С во всех исследованных структурах. Введение ЛПС не влияло на активность ТПГ2. Введение ЛПС существенно увеличивало уровень 5-НТ и 5-Н1АА в среднем мозге только у мышей В6-1473С, но не у В6-1473G ($p < 0,01$). В то же время, ЛПС снижал уровень 5-НТ в гипоталамусе у мышей В6-1473G ($p < 0,05$). ЛПС не влиял на уровень 5-НТ и 5-Н1АА в гиппокампе мышей обеих линий.

Таким образом, показано, что в ювенильном возрасте инфекция (введение ЛПС) активирует 5-НТ систему среднего мозга только у мышей дикого типа (В6-1473С), что, по-видимому, позволяет им пережить инфекцию. В то время как, у мутантных мышей (В6-1473G) этой активации не наблюдается, что приводит к высокой смертности животных. Можно предположить, что определяемая активностью ТПГ2 реакция ювенильных мышей на инфекцию является одним из факторов естественного отбора против аллели 1473G.

Исследование было поддержано РФ (грант № 21-15-00035).

Возрастные изменения в серотониновой системе и серотонин-зависимом поведении у рыб видов *Nothobranchius furzeri* и *Danio rerio*

Евсюкова В.С.^{1,2,*}, Сорокин И.Е.¹, Арефьева А.Б.¹, Куликова Е.А.¹, Базовкина Д.В.¹,
Куликов А.В.^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск

*v.s.evsiukova@gmail.com

Изучение изменений в центральной нервной системе при старении является актуальной фундаментальной проблемой нейробиологии. Серотониновая (5-НТ) система головного мозга участвует в механизмах регуляции большого числа физиологических функций и видов поведения, а её дисфункции связаны с тяжелыми психопатологиями. Не исключено, что 5-НТ система вовлечена в механизм возрастных нарушений нервной системы и психики.

Рыбы вида *Danio rerio*, благодаря значительной анатомической, молекулярной и фармакологической гомологии 5-НТ системы мозга с млекопитающими, являются перспективной моделью для изучения нейрофизиологии 5-НТ системы и 5-НТ зависимого поведения. Рыбы вида *Nothobranchius furzeri* являются наиболее короткоживущими позвоночными животными, из тех, чья продолжительность жизни была четко установлена в лабораторных условиях. Молекулярная биология, биохимия и фармакология 5-НТ системы мозга *N. furzeri* совсем не изучена, но можно ожидать, что она будет гомологичной таковой у *D. rerio*. Поэтому, *N. furzeri* потенциально могут быть идеальным модельным объектом для изучения изменения в 5-НТ системе мозга и в 5-НТ зависимом поведении в процессе старения.

Цель работы – сравнительное исследование половых и возрастных изменений в 5-НТ системе мозга и выраженности 5-НТ зависимого поведения в тесте «Новый аквариум» у рыб видов *N. furzeri* – модели ускоренного старения и у рыб вида *D. rerio* – классического модельного объекта с нормальным процессом старения.

У старых самок *D. rerio* показано снижение двигательной и исследовательской активности. Время нахождения у дна аквариума увеличивается у *D. rerio* в возрасте 12 и 24 месяца по сравнению с молодыми (6 месяцев) особями, и, затем, снижается у старых (36 месяцев) рыб. Выявлено снижение уровня 5-НТ в мозге старых самцов и самок *N. furzeri*. Это сопровождается снижением активности триптофангидроксилазы (ТПГ) и увеличением активности моноаминоксидазы (МАО) в мозге старых самцов и самок *N. furzeri*. Был обнаружен существенный половой диморфизм в экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма и рецепторы 5-НТ в мозге *N. furzeri*. Экспрессия генов *Tph1a*, *Tph1b*, *Tph2* была выше у самцов, тогда как гена *Htr2aa* – у самок *N. furzeri*. Экспрессия генов *Mao* и *Htr1aa* прогрессивно снижалась в мозге старых самцов и самок. Не выявлено изменений в уровне 5-НТ в мозге *D. rerio*. Активность ТПГ снижалась, а МАО – повышалась в мозге старых *D. rerio*. С возрастом экспрессия гена *Htr1aa* прогрессивно снижалась в мозге *D. rerio*. Выявленные возрастные изменения в активности ферментов и экспрессии генов хорошо согласуются с возрастными изменениями их гомологов в мозге млекопитающих. Это свидетельствует об общих и фундаментальных закономерностях изменений в 5-НТ системе мозга позвоночных в процессе старения и позволяет использовать рыб данных видов для их изучения и поиска методов терапии психических нарушений при старении.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-15-00035).

Влияние бензопентатиепина ТС-2153 на ключевые ферменты серотониновой системы триптофангидроксилаза 2 и моноаминоксидаза А в мозге ручных и агрессивных крыс

Москалюк В.С.^{*}, Кожемякина Р.В., Науменко В.С., Куликова Е.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

^{*}v.moskaliuk@alumni.nsu.ru

Бензопентатиепин ТС-2153 (НИОХ СО РАН, Россия) обладает рядом полезных психотропных свойств, в частности анксиолитическим, антикаталептическим и антидепрессантным действием. Более того, данное вещество оказало выраженный антиагрессивный эффект в модели агрессии, вызванной страхом: серые крысы, селекционированные на протяжении 90 поколений в Институте цитологии и генетики СО РАН в Новосибирске на агрессивное поведение по отношению к человеку (агрессивные) и его отсутствие (ручные). Кроме того, ТС-2153 демонстрирует влияние на серотониновую систему, которая играет существенную роль в регуляции агрессивного поведения. Ключевыми ферментами этой системы являются триптофангидроксилаза 2 (ТПГ-2), которая катализирует лимитирующую стадию синтеза серотонина, и моноаминоксидаза А (МАОА), деактивирующая его путем превращения в 5-гидроксииндолилуксусную кислоту. Известна связь этих ферментов с агрессивным поведением, однако действие ТС-2153 на их экспрессию и активность у агрессивных и ручных крыс ранее не изучалось.

Целью данной работы было исследовать влияние бензопентатиепина ТС-2153 на активность и экспрессию ТПГ-2 и МАОА в мозге ручных и агрессивных крыс.

Агрессивным (n=24) и ручным (n=24) половозрелым самцам серых крыс однократно внутрибрюшинно вводили ТС-2153 в дозах 10 и 20 мг/кг или растворитель, и спустя 5 часов животные были выведены из эксперимента. В среднем мозге, гиппокампе и гипоталамусе исследовали уровни белков ТПГ-2 и МАОА с помощью Вестерн блот анализа, их ферментативную активность с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофотометрии соответственно, а также экспрессию генов, кодирующих эти ферменты методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Экспрессия гена *Tph2*, кодирующего ТПГ-2, была повышена в среднем мозге агрессивных крыс по сравнению с ручными. В то же время уровень белка ТПГ-2 был повышен у агрессивных крыс в гиппокампе и гипоталамусе, но не в среднем мозге. Также в гипоталамусе агрессивных крыс наблюдался повышенный уровень белка МАОА. Активность ТПГ-2 была выше в гиппокампе крыс агрессивной линии, в то время как активность МАОА между двумя генотипами не различалась.

Острое введение ТС-2153 повысило активность как ТПГ-2, так и МАОА, в гиппокампе ручных крыс и снизило активность ТПГ-2 в гипоталамусе крыс обоих генотипов. Более того, бензопентатиепин ТС-2153 повлиял на уровень белка МАОА, повысив его в гипоталамусе крыс агрессивной линии и снизив в этой же структуре у ручных. Таким образом, селекция серых крыс на агрессивное поведение по отношению к человеку и его отсутствие привела к существенным изменениям в экспрессии и активности ключевых ферментов серотониновой системы. Данные о влиянии бензопентатиепина ТС-2153 на ТПГ2 и МАОА расширяют представления о связи этого вещества с серотониновой системой и помогают глубже понять механизмы его действия.

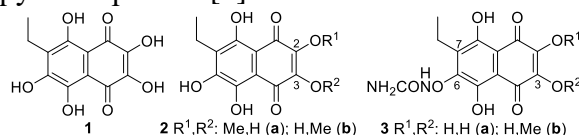
Исследования выполнены при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0010.

Метаболический профиль эхинохрома, субстанции лекарственного препарата гистохром. Новые данные

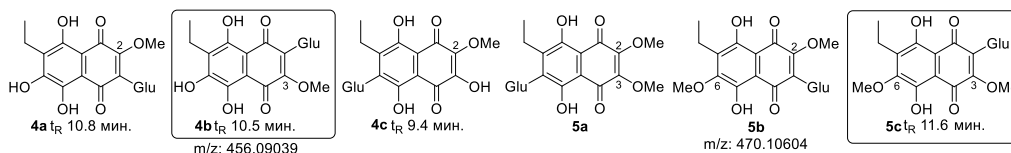
Закирова А.Е.^{*}, Попов Р.С., Маханьков В.В., Ануфриев В.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
*zakirova@piboc.dvo.ru

Методом хромато-масс спектрометрии высокого разрешения, с использованием D-метки, в почечных экскретах мышей, после введения эхинохрома, были детектированы одиннадцать метаболитов [1,2]. Строение трех из них, эхинохрома (**1**) и 2(3)-метоксипроизводных **2a,b** было установлено методом сравнения с заведомыми образцами. При этом было показано, что в условиях МС/МС спектрометрии, основным путем фрагментации d₃-эхинохрома и его 2(3)-метоксипроизводных **2a,b** является отщепление метана (CHD₃), что указывает на смежное расположение 7-этильной и 6-гидроксигруппы в субстратах [1]. Это наблюдение позволило однозначно установить структуру конъюгата эхинохрома с гидроксимочевинной **3a** (*m/z* 324.05937). В его МС/МС спектре отсутствовал пик с *m/z* 249.000(**4**) указывающий на блокирование β-гидроксигруппы при С-6 [2].



Как было установлено, все метаболиты, детектированные в экскретах, являются производными 2(3)-метоксипроизводных эхинохрома [1]. В связи с этим, был изучен состав почечных экскретов, после введения 2-метоксипроизводного **2a**, для выявления метаболитов, относящихся к этому ряду. Было установлено, что в почечных экскретах мышей, после введения этого соединения, сам эхинохром не обнаружен. Это указывает на то, что обнаружение соответствующих 3-метоксипроизводных также исключается. По этой причине, конъюгат 3-метилового эфира эхинохрома с гидроксимочевинной (*t_R* 10,3 мин) (*m/z* 337,0661) имеет строение **3b**.



Из четырех возможных моноглюкуронидов с *m/z* 456,09039, указанным методом было обнаружено три, из них два, при введении 2-метоксипроизводного **2a**. Как и ожидалось, в МС/МС спектре одного из продуктов (*t_R* 10,8 мин) наблюдается пик с *m/z* 249,000(**4**), что однозначно указывает на структуру **4a**. По той же причине, метаболиту с *t_R* 10,5 мин, который образовывался при введении эхинохрома [1], но не обнаружился при использовании 2-метоксипроизводного, соответствует структура **4b**. Вторым продуктом (*t_R* 9,4 мин), согласно полученным данным, явился глюкуронид **4c**, поскольку в его МС/МС спектре отсутствует сигнал с *m/z* 249,000(**4**). Из трёх производных эхинохрома с *m/z* 470,10604, указанным методом детектированы глюкурониды 2,3- (**5a**) и 2,6-диметоксипроизводного (**5b**) эхинохрома (*t_R* 10,4 и 10,9 мин). Окончательное отнесение времен удерживания и структур **5a,b** возможно при синтезе одного из этих изомеров, предпочтительно первого из них. 3,6-диметоксипроизводное с *t_R* 11,6 мин [1], по причине отсутствия метоксигруппы при С-2, обнаружено не было, что не помешало приписать ему строение **5c**.

Ссылки:

1. А.Е. Zakirova, R.S. Popov, V.V. Makhan'kov, B.P. Mashnev, V.Ph. Anufriev, *Chem. Nat. Comp.*, **2023**, 59, 21;
2. А.Е. Закирова, Р.С. Попов, В.В. Маханьков, В.Ф. Ануфриев, *Химия природ. соедин.* **2023**, 763.

Сравнение реологических свойств нагруженных эхинохромом плёнок на основе каррагинанов различных структурных типов

Володько А.В.^{*}, Ермак И.М.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
^{*}morskaia@list.ru

Системы доставки лекарств (СДЛ) – это современная форма терапии при лечении многих заболеваний. Благодаря использованию СДЛ можно преодолеть ограничения и недостатки обычного применения лекарств, такие как плохое биораспределение, высокие терапевтические дозы и отсутствие селективности. СДЛ обеспечивают доставку активного вещества к месту действия, защищают его от быстрой деградации и увеличивают концентрацию лекарства в тканях-мишенях, что приводит к снижению дозировки. Полисахариды морского происхождения, такие как каррагинан (КРГ) представляют большой интерес для создания СДЛ благодаря своей структуре, физико-химическим свойствам, доступности получения и разнообразию возобновляемых источников.

На основе КРГов различных структурных типов (κ/β -, κ -, χ -, λ -) получены пустые и нагруженные эхинохромом (ЭХ) плёнки толщиной 10–12 мкм и влажностью не более 10 % для оценки их применения в офтальмологии. Все исследованные плёнки имели гидрофильную поверхность. Вязкость растворов определялась как функция скорости сдвига, как для исходных растворов КРГ, так и для содержащих ЭХ. Ньютоновское поведение наблюдалось для растворов λ - и χ -КРГ. Преимуществом офтальмологических препаратов для местного применения являются псевдопластические свойства [1], так как это свойство обеспечивает хорошее растекание полимера по поверхности глаза при моргании. Этим характеристикам среди исследованных нами образцов соответствовали κ - и κ/β -КРГ, что можно объяснить способностью этих типов КРГов образовывать гели с ионами K^+ и Ca^{2+} . Ионно-активируемые гелеобразующие системы *in situ* обладают большим потенциалом в качестве систем доставки лекарств в глаза из-за присутствия в слезах глаз моно- и двухвалентных катионов, таких как Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} . Взаимодействие с солями, присутствующими в слезах, влияет на свойства κ - и κ/β -КРГ.

Ротационным вискозиметром также была охарактеризована вязкость пленок КРГ+ЭХ, растворенных в слезной жидкости (имитация поведения плёнки в контакте со слезой) и воде. Пленка κ/β -КРГ/ЭХ полностью не растворялась в искусственной слезе, что согласуется с неограниченным набуханием этой пленки в условиях данного эксперимента. Такое поведение можно объяснить структурными особенностями КРГов, имеющих гибридную структуру, состоящую из κ - и β -звеньев. Конформация двойной спирали, характерная для КРГов, содержащих 3,6-ангидрогалактозу, способствует образованию прочных ассоциатов за счет кооперативного характера всех видов взаимодействий, что способствует снижению растворимости пленок κ/β -КРГ. В водных растворах менее заряженные κ/β -КРГ имеют тенденцию объединяться в более крупные агрегаты, особенно в присутствии катионов [2], которые могут обеспечить высокую степень набухания. Длительное набухание пленки κ/β -КРГ может быть полезным для менее чувствительной поверхности слизистой оболочки, чем роговица. Только в случае κ -КРГ+ЭХ вязкость увеличилась. Это может обеспечить больший комфорт при использовании данной пленки на слизистой оболочке глаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 21-74-20019.

Ссылки:

1. Otero-Espinar, F.J.; Fernández-Ferreiro, A.; González-Barcia, M.; Blanco-Méndez, J.; Luzardo, A. Stimuli Sensitive Ocular Drug Delivery Systems. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*; **2018**; 211–270.
2. van de Velde, F. Structure and Function of Hybrid Carrageenans. *Food Hydrocoll.* **2008**, *22*, 727–734.

Биологическая активность лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

Мизгина Т.О. *, Чикаловец И.В., Черников О.В.

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

*tanya.tasha@mail.ru

За всю историю эволюции морские организмы приобрели множество защитных механизмов, которые позволяют им бороться с враждебной средой. Двустворчатые моллюски, являясь фильтрующими организмами, постоянно подвергаются воздействию широкого спектра потенциально патогенных микроорганизмов, токсинов и антропогенных загрязнителей. Ввиду отсутствия адаптивного иммунитета, защиту двустворчатых моллюсков осуществляет врожденная иммунная система, способная различать «свои» (эндогенные) и «чужие» (экзогенные) лиганды и быстро реагировать на инфекции. Этот ответ опосредован молекулами, известными как рецепторы распознавания паттернов (ППР), которые распознают присущие всем патогенным микроорганизмам консервативные молекулярные структуры, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП). Лектины представляют собой хорошо охарактеризованное семейство ППП, способных обратимо связываться с углеводами и гликоконъюгатами.

Ранее из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* были выделены и частично охарактеризованы L-рамнозсвязывающий лектин (GYL-R) и муцин-специфичный Ca^{2+} -зависимый лектин (GYL). Для определения функций исследуемых лектинов в организме моллюска была изучена их принадлежность к ППП. На первом этапе определяли способность лектинов связываться с основными видами ПАМП (ЛПС *Escherichia coli* O111:B4, пептидогликан *Staphylococcus aureus*, α -D-маннан *S. cerevisiae*, β -1,3-глюкан *Euglena gracilis*). Установили, что GYL-R высокоспецифично связывался только с ЛПС по сравнению с остальными ПАМП. Связывание GYL с исследуемыми паттернами убывало в ряду: пептидогликан > ЛПС > β -1,3-глюкан > α -D-маннан. Затем, было исследовано взаимодействие GYL и GYL-R с целыми клетками микроорганизмов, включая грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*), грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *Vibrio proteolyticus*) и дрожжи *Candida albicans*. Методом твердофазного лектин-ферментного анализа было показано, что GYL-R высокоспецифично связывался с грамотрицательной бактерией *E. coli* и обладал минимальной аффинностью по отношению к остальным микроорганизмам. GYL обладал широким спектром связывания микробов, взаимодействуя со всеми протестированными типами микроорганизмов с разной интенсивностью.

Характер взаимодействия лектинов с микроорганизмами устанавливали методом микроскопии, изучая способность лектинов агглютинировать микробиальные клетки в растворе. В результате были выявлены крупные уплотненные конгломераты, которые и служили подтверждением агглютинирующих свойств лектинов. Установлено, что GYL-R агглютинирует только грамотрицательную бактерию *E. coli*. Для GYL выявлена агглютинирующая активность в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis*, *S. aureus* и грамотрицательной бактерии *E. coli*. В эксперименте по ингибированию связывания лектина с микроорганизмами показано, что связывание происходит по лектинному пути через распознавание углеводов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что GYL-R и GYL распознают микроорганизмы и взаимодействуют непосредственно с компонентами их клеточной стенки, что указывает на принадлежность лектинов к ППП. Можно предположить, что исследуемые лектины являются компонентами врожденной иммунной системы моллюска и участвуют в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 23-24-00485.

Стендовые доклады

Ферментоподобная активность золей GeO_2

Веселова В.О.^{*}, Филиппова А.Д., Гайтко О.М.

Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва

^{*}ibvarvara@yandex.ru

Оксидные наночастицы, проявляющие ферментоподобную активность (ФПА) – так называемые нанозимы – привлекают большое внимание исследователей. Для колориметрического анализа катализируемых ферментами соединений необходимы нанозимы белого цвета [1].

В данной работе была изучена ФПА оксида германия. Золи оксида германия были получены гидролизом хлорида германия в присутствии эпихлоргидрина в этиловом ($\text{GeO}_2\text{-EtOH}$), бутиловом ($\text{GeO}_2\text{-ButOH}$) и изопропиловом спиртах ($\text{GeO}_2\text{-iPrOH}$), а также диспергированием GeO_2 в водном растворе аммиака ($\text{GeO}_2\text{-NH}_3$). ФПА (пероксидазную/каталазную) золей диоксида германия исследовали с использованием реакции окисления люминола в присутствии пероксида водорода. В качестве среды использовали фосфатный буферный раствор (ФБР) и буферный раствор Tris-HCl.

Золи, полученные при гидролизе хлорида германия в этиловом и изопропиловом спиртах, не проявили выраженной ФПА в фосфат-содержащей среде. При использовании буферного раствора Tris-HCl золи $\text{GeO}_2\text{-EtOH}$ и $\text{GeO}_2\text{-iPrOH}$ проявили прооксидантную активность, вероятно, пероксидазоподобную. Для данных образцов также наблюдалась концентрационная зависимость прооксидантной активности. Образец $\text{GeO}_2\text{-ButOH}$ проявил антиоксидантную активность, вероятно, каталазоподобную.

Изучение золей, полученных при гидролизе GeCl_4 методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), показало, что эти золи представляют собой иерархические структуры, первый структурный уровень которых состоит из сферических неоднородностей (частиц) с характерными размерами 9-18 нм. В золях с прооксидантной активностью частицы обладают фрактальной поверхностью, а в случае золя $\text{GeO}_2\text{-ButOH}$ они обладают «диффузной» границей раздела фаз.

Для золя $\text{GeO}_2\text{-NH}_3$ была обнаружена концентрационная зависимость ФПА (Рисунок 1). При добавлении золя концентрацией 4 и 11 нМ в реакционную смесь, интенсивность хемилюминесценции люминола снижается по сравнению с контролем. Добавление 2 нМ золя приводит к небольшому повышению интенсивности свечения люминола.

Полученный результат указывает на «переключение» ФПА оксида германия (IV), в зависимости от концентрации, присутствия фосфат-ионов, природы поверхности и метода получения. Точный контроль каталитической активности нанозимов открывает огромный потенциал для модуляции каталитической селективности и эффективности биоприложений.

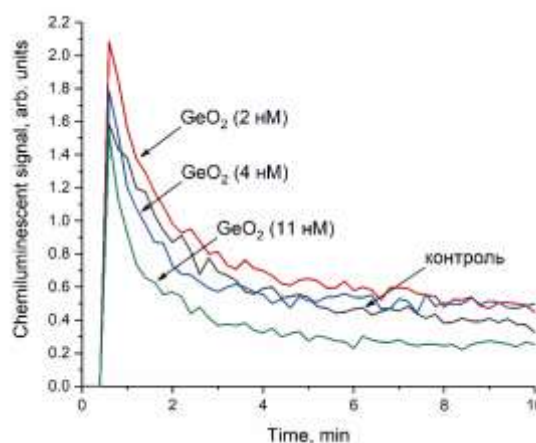


Рисунок 1. Кинетические зависимости хемилюминесценции люминола в присутствии H_2O_2 (10 мМ) и золя $\text{GeO}_2\text{-NH}_3$ в ФБР

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 22-73-10182.

Ссылки:

1. Liang, X.; Han, L. White peroxidase-mimicking nanozymes: colorimetric pesticide assay without interferences of O_2 and color. *Advanced functional materials* **2020**, 30(28), 2001933.

Получение белка NS1 для дифференциальной диагностики ОГЛ

Кравчук Б.И.^{1,*}, Хлусевич Я.А.¹, Матвеев А.Л.¹, Чичерина Г.С.², Краснова Е.И.³,
Филимонова Е.С.³, Тикунова Н.В.¹

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

²ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск

³ФГБОУ ВО Минздрава России Новосибирский государственный медицинский
университет, Новосибирск

*bogdakravchuk@gmail.com

Омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ) является зоонозным инфекционным заболеванием, зарегистрированным только в нескольких регионах РФ и Республики Казахстан. Инфекция вызывается вирусом омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ), содержащим одноцепочечный (+) РНК-геном. ВОГЛ принадлежит к комплексу флавивирусов клещевого энцефалита (КЭ) семейства Flaviviridae. В течение инкубационного периода у инфицированных людей развиваются неспецифические гриппоподобные симптомы. Диагностика этой инфекции является симптоматической, и в случае отсутствия геморрагических проявлений данное заболевание остается не диагностируемым. ВОГЛ передается человеку при укусе клещами, при прямом контакте с инфицированными животными, воздушно-капельным или пищевым путем. Для диагностики ВОГЛ, как и для других флавивирусов, использование молекулярно-генетических методов ограничено из-за особенностей жизненного цикла этих вирусов в организме человека. Поэтому диагностика ОГЛ основана на клинических признаках, а наличие кросс-реактивности между антителами сыворотки против белка Е ВКЭ и ВОГЛ исключает использование существующих серологических наборов для дифференциальной диагностики этих заболеваний. Дополнительной трудностью для дифференциальной диагностики ВОГЛ и ВКЭ является вероятность возникновения геморрагических форм клещевого энцефалита, которые были описаны ранее в литературе. Известно, что наиболее подходящим агентом для дифференциальной серологической диагностики флавивирусов является неструктурный белок NS1.

В связи с этим нами была исследована панель моноклональных антител против белка NS1 ВКЭ и панель сывороток от переболевших КЭ на способность выявлять белок NS1 ВОГЛ в ИФА и вестерн блот анализе. В результате работы была получена плаزمид рЕТ-32a(+)_NS1OHFV, экспрессирующая белок NS1 ВОГЛ, и препарат очищенного белка NS1 ВОГЛ. ПЦР-фрагменты, кодирующие белок NS1 ВОГЛ (NC_005062.1) были получены из суммарной РНК, выделенной из лизата мозга зараженной ВОГЛ мыши. Методами вестерн блот анализа и ИФА с использованием полученного белка NS1 ВОГЛ было показано, что моноклональные антитела против NS1 ВКЭ выявляли белок NS1 ВКЭ, но не выявляли белок NS1 ВОГЛ. В качестве положительного контроля использовали антитела против His-мотива на С-конце и иммунную сыворотку, полученную от инфицированных ВОГЛ мышей. Поскольку моноклональные антитела не выявили NS1 ВОГЛ, нами были исследованы сыворотки, полученные от больных КЭ, на наличие антител к NS1 ВОГЛ. Для контроля проведения анализа были использованы сыворотки, полученные от здоровых добровольцев. Специфичность ИФА составила не менее 90%.

Впервые был получен белок NS1 ВОГЛ, а также впервые было показано, что моноклональные антитела против белка NS1 ВКЭ не взаимодействуют с этим белком. При исследовании сывороток от пациентов с КЭ, содержащих антитела к белку NS1 ВКЭ не были обнаружены кросс-реактивные антитела к белку NS1 ВОГЛ. Таким образом, было показано, что белок NS1 ВОГЛ может быть использован в дальнейшем для дифференциальной диагностики омской геморрагической лихорадки от клещевого энцефалита.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10103, <https://rscf.ru/project/22-74-10103/>.

Влияние фекотрансплантации и введения стерильного копрофильтрата на микробиом пациентов с язвенным колитом

Федорец В.А.*, Тикунов А.Ю., Шрайнер Е.В., Чечушков А.В., Морозов В.В.,
Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
*v.fedorets@g.nsu.ru

Язвенный колит (ЯК) – это хроническое воспалительное заболевание дистальных отделов кишечника с неустановленной этиологией и предположительно многофакторным патогенезом. Возможными способами лечения являются нормальная и стерильная фекотрансплантация (ФТ и СФТ). ФТ – непосредственное введение микробиоты от здорового донора в кишечник пациента; СФТ – введение стерильного копрофильтрата.

Цель данной работы – сравнить влияние ФТ и СФТ на кишечный микробиом пациентов с язвенным колитом. В ходе работы были созданы 68 библиотек ампликонов переменных участков (V3-V4) гена 16S рРНК (25 библиотек для пациентов до лечения, 20 библиотек для пациентов после ФТ, 5 библиотек для пациентов после СФТ, 18 библиотек для здоровых добровольцев), которые секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Результаты анализировали с использованием пакета программного обеспечения QIIME 2.

Результаты исследования показали, что биоразнообразие микробиоты пациентов с ЯК до лечения было достоверно ниже, чем у здоровых людей и у пациентов после ФТ ($p \leq 0,05$). Разнообразие микробиоты пациентов после СФТ в среднем было также выше, чем у пациентов до лечения, однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,23$). Анализ таксономического состава показал, что бактериальное сообщество выборки здоровых добровольцев соответствует таковому, описанному для других популяций здоровых людей. Статистический сравнительный анализ разнообразия между выборками здоровых людей и пациентов с ЯК до лечения показал достоверное снижение у пациентов долей типов *Desulfobacterota* и *Synergistota*. Также у них было выявлено повышение доли некоторых протеобактерий, а именно родов *Sphingomonas*, *Vibrio* и *Halomonas*.

После ФТ единственным отличием микробиома пациентов от микробиома здоровых людей было повышение доли последовательностей некоторых *Bacteroidota*, являющихся одними из основных представителей нормальной кишечной микробиоты. Однако у 5 пациентов после ФТ было обнаружено значительное повышение доли рода *Fusobacterium* одновременно со снижением биоразнообразия, что может говорить о инвазивности этих бактерий. Микробиом пациентов после СФТ содержал достоверно больше последовательностей, относящихся к семейству *Lachnospiraceae*, причем как относительно пациентов до лечения и здоровых людей, так и относительно пациентов после ФТ. Известно, что представители данного семейства продуцируют метаболиты, оказывающие благотворное влияние на кишечник человека.

Таким образом, было показано, что как нормальная, так и стерильная фекотрансплантация, в целом, приводят к нормализации таксономического состава кишечной микробиоты пациентов с ЯК. Однако при нормальной ФТ есть риск введения в кишечник пациента потенциально инвазивных бактерий. В то же время, ФТ приводит к достоверному повышению биоразнообразия микробиоты пациентов, в отличие от СФТ.

Работа выполнена по проекту РНФ № 21-14-00360.

Сайты наиболее эффективной ранней инициации репликации лежат в локусах генов экдизонового каскада у *Drosophila melanogaster*

Довгань В.В.^{1,*}, Колесникова Т.Д.^{1,2}, Похолкова Г.В.¹, Шуберт Ф.³

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

³Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур им. Лейбница, Гатерслебен

*dovgan@mcb.nsc.ru

В геноме эукариот существуют репликационные домены, границы которых с определенным приближением совпадают с границами доменов открытого и закрытого хроматина. Репликация таких доменов происходит в четком порядке, где активные части хроматина реплицируются в начале S фазы, а закрытые, молчащие участки во второй. Время репликации этих доменов с высокой точностью воспроизводится в клеточных поколениях, однако внутри них события инициации репликации имеют стохастическую природу, потому что большинство потенциальных ориджинов имеют низкую вероятность активации в клеточном цикле, т.е. они низкоэффективны.

Для изучения вероятностных событий, таких как инициация репликации, интересным инструментом являются политенные хромосомы слюнных желез личинок *Drosophila melanogaster*, в которых более 2х тысяч нитей ДНК выровнены относительно друг друга. При помощи микроскопии сверхвысокого разрешения со структурированным освещением 3D-SIM мы обнаружили сайты высокоэффективной инициации репликации, где большинство нитей ДНК активировало репликацию в первые минуты S фазы, и зоны ориджинов с низкой эффективностью, где за тот же период времени всего 5% нитей инициировали репликацию. Предположив, что высокоэффективные локусы связаны с активно транскрибируемыми генами, мы разработали подход для одновременной детекции ранней инициации репликации и активной транскрипции в политенных хромосомах слюнных желез, основанный на индукции эктопической S-фазы у личинок генотипа *hsp70-CycE* [1] с последующим импульсным включением модифицированного нуклеотида EdU в изолированные слюнные железы и иммунолокализации антител к активным формам РНК-полимеразы II [2].

На полученных фотографиях хромосом в первые минуты S фазы выявлялись лишь 30-40 сигналов очень ранней эффективной инициации репликации. Анализ распределения этих сигналов показал, что большинство из них связано с районами, образующими пучки и участвующими в генном каскаде, зависящем от гормона экдизона и приводящем к линьке насекомого. На примере двух таких районов, 46F и 3C, мы показали, что способность локуса инициировать репликацию рано и эффективно зависит от его транскрипционной активности и предваряет высокую экспрессию. На основании полученных результатов мы предполагаем, что именно регуляторные области экдизон-зависимых генов являются в геноме дрозофилы уникальными сайтами очень эффективной инициации репликации, в то время как по всему остальному геному локальная вероятность активации репликации значительно ниже.

Работа поддержана совместным русско-немецким грантом РФФИ № 20-54-12016.

Ссылки:

1. Knoblich J.A. et al. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell*. **1994**. 77, 107–120.
2. Kolesnikova T.D. et al. Super-resolution microscopy reveals stochastic initiation of replication in *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosome Res.* **2022**.

Фукоидан-деградирующие ферменты 141 структурного семейства гликозидгидролаз морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T

Рубцов Н.К.^{*}, Сильченко А.С., Ермакова С.П.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
^{*}rubtsov.nk@yandex.ru

Фукоиданы – сульфатированные гомо- и гетерополисахариды, состоящие преимущественно из остатков α-L-фукозы, обнаружены во всех известных на сегодняшний день бурых водорослях [1]. Сложная структура этих биополимеров и широкий спектр их биологической активности делают фукоиданы перспективным объектом исследования [1]. Существующие на сегодняшний день химические методы установления структур фукоиданов несовершенны и часто приводят к неудовлетворительным результатам. В связи с этим ферментативный гидролиз выглядит наиболее перспективно.

Наиболее актуальной задачей является изучение структурных фрагментов фукоиданов, ответственных за проявляемую ими биологическую активность. Использование арсенала различных охарактеризованных ферментов может помочь в решении данной задачи. Однако, данные ферменты слабо изучены, а некоторые еще не открыты. В настоящее время эндо-фукоиданазная активность обнаружена у представителей семейств 107, 168 и 174 гликозидгидролаз (GH, www.cazy.org). Поиск и изучение новых фукоидан-трансформирующих ферментов является необходимым для совершенствования и разработки новых методов изучения структур этих сложных биополимеров и получения производных с усиленными биологическими свойствами.

Ранее в геноме морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T нами был идентифицирован кластер генов, потенциально участвующий в деградации фукоиданов [2]. В состав данного кластера входят множество гликозидгидролаз различных семейств: GH29, GH43, GH107, GH141, а также GH168 [2].

В данной работе впервые представлены данные о способности некоторых представителей семейства GH141 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T участвовать в деполимеризации фукоиданов бурых водорослей. В настоящее время для семейства GH141 описаны представители обладающие либо фукозидазной, либо эндо-ксилазаназной активностями [3,4]. Таким образом, ферменты морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T являются первыми представителями семейства GH141, обладающими фукоиданазной активностью. Полученные нами данные расширяют познания о разнообразии функций, выполняемых представителями различных семейств гликозидгидролаз.

Ссылки:

1. Ale, M.T.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2106–2130, doi:10.3390/MD9102106.
2. Silchenko, A.S.; Rasin, A.B.; Zueva, A.O.; Kusaykin, M.I.; Zvyagintseva, T.N.; Kalinovsky, A.I.; Kurilenko, V. V.; Ermakova, S.P. Fucoidan Sulfatases from Marine Bacterium *Wenyngzhuangia Fucanilytica* CZ1127^T. *Biomolecules* **2018**, *8*, doi:10.3390/BIOM8040098.
3. Heinze, S.; Mechelke, M.; Kornberger, P.; Liebl, W.; Schwarz, W.H.; Zverlov, V. V. Identification of Endoxylanase XynE from *Clostridium Thermocellum* as the First Xylanase of Glycoside Hydrolase Family GH141. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11178, doi:10.1038/s41598-017-11598-y.
4. Ndeh, D.; Rogowski, A.; Cartmell, A.; Luis, A.S.; Baslé, A.; Gray, J.; Venditto, I.; Briggs, J.; Zhang, X.; Labourel, A.; et al. Complex Pectin Metabolism by Gut Bacteria Reveals Novel Catalytic Functions. *Nature* **2017**, *544*, 65–70, doi:10.1038/nature21725.

Синтетическое производное 1,4-нафтохинона U-556 обладает противоболевой и противовоспалительной активностью на моделях *in vitro* и *in vivo*

Козловский С.А.^{1,*}, Пислягин Е.А.¹, Менчинская Е.С.¹, Чингизова Е.А.¹, Калужский Л.А.²,
Иванов А.С.², Лихацкая Г.Н.¹, Агафонова И.Г.¹, Сабуцкий Ю.Е.¹, Полоник С.Г.¹,
Манжуло И.В.³, Аминин Д.Л.¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова, ДВО РАН,
Владивосток

²НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, РАН, Москва

³Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского, ДВО РАН,
Владивосток

*sergeimerx@gmail.com

Пуринергические рецепторы P2X7 типа это катион-проницаемые ионные каналы, которые активируются высокими концентрациями внеклеточного АТФ. Они играют важную роль в индукции воспалительных реакций, иммунного ответа и запуска процессов клеточной гибели. Нарушение функций данных рецепторов приводит к хроническим воспалительным и дегенеративным изменениям тканей. Поэтому P2X7 рецепторы рассматриваются в качестве перспективной фармакологической мишени [1]. Ранее было показано, что 1,4-нафтохиноны проявляют активность по отношению к P2X7 рецепторам и являются потенциально новым классом селективных антагонистов [2].

В данной работе было продемонстрировано, что тетрациклический хинон-тиоглюкозидный конъюгат (U-556), полученный из тиоглюкозида 1,4-нафтохинона, способен ингибировать биологические процессы, опосредованные активацией P2X7-рецептора. Показано, что соединение U-556 блокировало АТФ-индуцированный вход ионов кальция и флуоресцентных красителей в нейрональных клетках Neuro-2a [3] и макрофагальных клетках RAW 264.7. Кроме того, соединение U-556 снижало АТФ-индуцированную продукцию АФК и NO на данных клеточных моделях. Соединение U-556 также достоверно увеличивало жизнеспособность клеток в условиях токсического действия АТФ/ЛПС. Методом поверхностного плазмонного резонанса подтверждено связывание соединения U-556 с P2X7 рецептором и получены кинетические характеристики комплекса. При помощи молекулярного докинга установлено предположительное место связывания соединения U-556 с аллостерическим сайтом P2X7 рецептора. Соединение U-556 значительно снижает каррагинан-индуцированное воспаление и обладает противоболевой активностью на моделях *in vivo*. Полученные результаты позволяют рассматривать соединение U-556 в качестве потенциального антагониста P2X7 рецепторов и фармакологической основы для создания новых лекарственных препаратов.

Ссылки:

1. Savio, L.E.B.; de Andrade Mello, P.; da Silva, C.G.; Coutinho-Silva, R. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*.
2. Faria, R.X.; Oliveira, F.H.; Salles, J.P.; Oliveira, A.S.; von Ranke, N.L.; Bello, M.L.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C.; Louvis, A.R.; Martins, D.L.; et al. 1,4-Naphthoquinones Potently Inhibiting P2X7 Receptor Activity. *Eur J Med Chem* **2018**, *143*, 1361–1372, doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.033.
3. Pislyagin, E.; Kozlovskiy, S.; Menchinskaya, E.; Chingizova, E.; Likhatskaya, G.; Gorpenchenko, T.; Sabutski, Y.; Polonik, S.; Aminin, D. Synthetic 1,4-Naphthoquinones Inhibit P2X7 Receptors in Murine Neuroblastoma Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2021**, *31*, 115975, doi:10.1016/j.bmc.2020.115975.

Новые цвиттер-ионные олигонуклеотиды по реакции Штаудингера

Буракова Е.А.^{1,2}, Бизяев С.Н.^{1,2}, Чжихуэй Г.^{1,2}, Держалова А.Ш.^{1,2}, Фокина А.А.^{1,2,*},
Стеценко Д.А.^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск

*fokinaaa@bionet.nsc.ru

Реакция Штаудингера между сульфонилазидом и триалкилфосфитом в процессе твердофазного синтеза выступает подходящим способом получения широкого спектра производных олигонуклеотидов, модифицированных по фосфатной группе [1–3]. Ранее нами были синтезированы цвиттер-ионные олигонуклеотиды с сульфонилфосфорамидными группами, содержащими остатки четвертичного аммония [4] или вторичные аминогруппы [5], и исследованы их некоторые физико-химические свойства, в частности, сродство к комплементарным последовательностям ДНК и РНК. В данной работе представлено получение производных ДНК, содержащих новые цвиттер-ионные сульфонилфосфорамидные группы с боковыми цепями, содержащими остатки первичного амина или гуанидиниевые группы. Была разработана методика твердофазного синтеза олигонуклеотидов, содержащих одну или несколько цвиттер-ионных групп, которая позволяет получить высокий выход продукта. Олигонуклеотиды с новыми цвиттер-ионными группами показали термическую устойчивость дуплексов с ДНК и, в особенности, с РНК, соответствующую или превосходящую таковую у нативных олигодезоксинуклеотидов.

Работа поддержана РФФ (проект № 22-13-00212). Синтез олигонуклеотидов частично финансировался Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект НГУ FSUS-2020-0035).

Ссылки:

1. Прохорова, Д.В.; Челобанов, Б.П.; Буракова, Е.А.; Фокина, А.А.; Стеценко, Д.А. *Биоорган. химия* **2017**, *43*, 45–50.
2. Челобанов, Б.П.; Буракова, Е.А.; Прохорова, Д.В.; Фокина, А.А.; Стеценко, Д.А. *Биоорган. химия* **2017**, *43*, 644–649.
3. Burakova, E.A.; Derzhalova, A.Sh.; Chelobanov, B.P.; Fokina, A.A.; Stetsenko, D.A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2019**, *45*, 662–668.
4. Su, Y.; Edwards, P.J.V.; Stetsenko, D.A.; Filichev, V.V. *ChemBioChem.* **2020**, *21*, 2455–2466.
Патрушев, Д.Э.; Буракова, Е.А.; Бизяев, С.Н.; Фокина, А.А.; Стеценко, Д.А. *Молек. Биол.* **2023**, *57*, 340–349.

Исследование DGR-кассеты бактериофага LMMB

Панина Е.А.^{*}, Бабкин И.В., Волковинская А.И., Тикунова Н.В.

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

^{*}e.panina@g.nsu.ru

Основная часть виroma человека обитает в дистальном отделе желудочно-кишечного тракта и состоит из бактериофагов с двуцепочечной ДНК, имеющих хвостовую структуру. Недавно путем вычислительного анализа находящихся в открытом доступе метагеномных данных, полученных из образцов фекалий человека, был обнаружен новый ДНК-бактериофаг, получивший название crAssphage по названию программного обеспечения Cross-Assembly, которое использовалось для его обнаружения. Одной из отличительных особенностей генома crAssphage является DGR-кассета. Генерирующие разнообразие ретроэлементы (DGR)- это недавно открытый класс полезных мобильных элементов, которые изменяют последовательности ДНК и кодируемые ими белки. DGR функционируют по шаблону механизма обратной транскрипции (RT), вносящему нуклеотидные замены в определенные места конкретных генов.

Совсем недавно, в лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН, при исследовании образца фекального виroma человека был обнаружен новый crAss-подобный геном, содержащий генерирующий разнообразие ретроэлемент (DGR). Геном фага, называемого crAssphage LMMB, принадлежит роду-кандидату I подсемейства AlphacrAssvirinae. DGR-кассета crAssphage LMMB содержит все необходимые элементы: ген, кодирующий обратную транскриптазу (RT), целевой ген (TG), кодирующий белок хвостовой структуры, а также вариабельные и матричные повторы (VR и TR) с IMH (область инициации мутагенного хоминга) и IMH* последовательностей на 3'-конце VR и TR соответственно. Архитектура DGR-кассеты представляет собой TG-VR(IMH)-TR(IMH*)-RT, а вспомогательная вариабельная область (avd) в кассете не обнаружена.

В рамках нашего исследования мы планируем изучить механизм связывания обратной транскриптазы с целевой последовательностью фага LMMB, а также, в дальнейшем, отследить влияние аденинового мутагенеза на VR-зависимый белок. Для этих целей в лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН были получены рекомбинантные белки: RT (обратная транскриптаза) и HP (белок, предположительно являющийся основной детерминантой связывания), а также, продуцирующие их штаммы: *E. coli* DH/pQE_60HP и *E. coli* BL21/ pET32_RT, *E. coli* toro 10/ pQE60_RT.

В ходе нашей работы было проведено неспецифическое пробное связывание с матрицами РНК и ДНК (содержащими GC-участки). Было показано, что, полученная ранее обратная транскриптаза обладает способностью связываться с оцДНК, однако, в случае с оцРНК связывания не наблюдается. Также было проведено исследование активности обратной транскриптазы, как самой по себе, так и при участии белка HP на специфической синтетической РНК-матрице.

Фукоиданы бурых водорослей семейства *Laminariaceae* и наночастицы на их основе

Шкрабов Р.А. *, Усольцева Р.В., Шевченко Н.М., Кусайкин М.И., Расин А.Б., Ермакова С.П.
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
*Shkrabov.ra@outlook.com

Фукоиданы – водорастворимые сульфатированные полисахариды бурых водорослей, обладающие иммуностимулирующим, радиопротекторным, противоопухолевым, противовоспалительным, противовирусным и другими видами биологического действия. За счёт низкой токсичности, биоразлагаемости и биосовместимости они являются перспективными соединениями для создания систем доставки лекарственных соединений. Одними из распространенных носителей являются наночастицы на основе фукоидана и хитозана, собранные полиэлектrolитным методом самосборки.

Целью данной работы является выделение фукоиданов из бурых водорослей *Saccharina sculpera*, *Saccharina bongardiana*, *Saccharina cichorioides*, изучение их строения, а также получение на их основе наночастиц с хитозаном и исследование их характеристик.

Водорастворимые полисахариды экстрагировали из водоросли раствором 0,1 М соляной кислоты при температуре 60°C, затем отделяли и очищали фукоиданы с помощью анионообменной хроматографии на DEAE-Macro Prep. Выход SscF из *S. sculpera*, SbF1 и SbF2 из *S. bongardiana*, и ScF из *S. cichorioides* составил 2,8%, 0,98%, 0,48%, 4,5% от веса сухой обезжиренной водоросли соответственно. Анализ моносахаридного состава и содержания сульфатных групп показал, что SscF является среднесульфатированным (25%) фуканом с незначительными примесями галактозы, SbF1 – низкосульфатированным (10%) гетерополисахаридом, SbF2 и ScF высокосульфатированными (31% и 36% соответственно) фуканами с незначительными примесями галактозы. Исследование молекулярно-массового распределения полученных фуканов показало, что средний молекулярный вес SscF, SbF2 и ScF составил 142 кДа, 378 кДа и 773 кДа соответственно. По данным спектроскопии ЯМР ¹³C было показано, что все фуканы содержат основную цепь преимущественно из 1,3-связанных остатков α-L-фукозы и сульфатные группы по положениям 2 и 4. Данные масс-спектрометрии показали наличие единичных ответвлений при втором атоме углерода у каждого исследуемого фукоидана.

Исследованы стабильность и дзета-потенциал наночастиц, которые были получены на основе взаимодействия фукоиданов SscF, SbF2 и ScF с хитозаном в молярном соотношении 2:1. Хитозан произведен компанией Sigma-Aldrich, его молекулярная масса – 265 кДа, степень дезацетилирования – 75%. Полученные наночастицы с фукоиданом SscF были стабильны в течение 8 дней, их средний размер составил 437 нм, а дзета-потенциал –50,3 мВ. Наночастицы с фукоиданом SbF2 были стабильны в течение 6 дней, средний размер составил 538 нм, а дзета-потенциал –34 мВ. Наночастицы на основе фукоидана ScF стабильными не являлись и сразу агрегировали.

Методом изотермической титрационной калориметрии были исследованы характеристики связывания между хитозаном и фукоиданами SscF и SbF2. Было показано что процесс образования наночастиц с фукоиданом SbF2 является двухстадийным, с фукоиданом SscF – трехстадийным, что обусловлено структурными различиями используемых фукоиданов.

Таким образом, из *S. sculpera*, *S. cichorioides*, *S. bongardiana* были выделены и охарактеризованы сульфатированные фуканы. Исследована возможность получения наночастиц на основе фуканов и хитозана. Выявлено, что более низкомолекулярные фукоиданы SbF2 и SscF являются предпочтительными для получения наночастиц, в то время как на основе ScF наночастицы не образуются. Показано, что наночастицы на основе фукоидана SscF и хитозана являются наиболее оптимальными для использования в таргетной доставке лекарств.

Эндолизины стафилококковых бактериофагов: конструирование и изучение их свойств

Голосова Н.Н.^{*}, Матвеев А.Л., Козлова Ю.Н., Тикунов А.Ю., Морозова В.В., Тикунова Н.В.
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
^{*}n.golosova@g.nsu.ru

Появление у бактерий резистентности к антибиотикам было обнаружено практически одновременно с началом их применения. В последние годы множественная резистентность бактерий к антибиотикам становится серьезной угрозой для здравоохранения, решение которой требует разработки новых антибактериальных средств. Перспективными кандидатами для создания новых антибактериальных препаратов считаются гидролитические ферменты бактериофагов. Эндолизины – это фаговые белки, способные разрушать пептидогликаны клеточной стенки бактерий. Эффективность эндолизинов и их производных против инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями, была показана в модельных экспериментах.

Представители рода *Staphylococcus* являются комменсалами кожных и слизистых покровов человека и животных, однако при ослаблении иммунитета они способны вызывать ряд инфекционных заболеваний, лечение которых может осложняться образованием биопленок, повышающих резистентность к антибиотикам. В 2017 году ВОЗ отнесла устойчивые к метициллину и ванкомицину штаммы *S. aureus* (MRSA и VRSA) к группе высокого приоритета по необходимости разработки новых антибактериальных препаратов.

Ранее в нашей лаборатории был изолирован бактериофаг SA120 (сем. Rountreeviridae), обладающий литической активностью в отношении *Staphylococcus aureus*. В геноме этого бактериофага были выявлены гены, кодирующие эндолизины LysSA120 и LysSA120_N. Один из этих белков, предположительно, является вирион-ассоциированной пептидогликангидролазой, а другой белок – классическим эндолизином, участвующим в завершении литического цикла бактериофага. На основе выявленных генов созданы штаммы *E. coli* M15/pQE-60_LysSA120 и *E. coli* M15/pQE-60_LysSA120_N, продуцирующие данные белки. Зимографический анализ гидролитических свойств эндолизинов LysSA120 и LysSA120_N показал наличие у белков гидролитической активности относительно пептидогликана клеточных стенок клинических штаммов бактерий рода *Staphylococcus* из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Среди них есть штаммы *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, обладающие антибиотикорезистентностью. Эксперименты на биопленках показали способность LysSA120 разрушать биопленки сформированные различными стафилококками. Таким образом, были получены штаммы-продуценты рекомбинантных эндолизинов LysSA120 и LysSA120_N и показан спектр их пептидогликан-гидролизующей активности.

Исследования выполнены при поддержке Госзадания 0245-2022-0005 (№ 075-03-2022-371/4) ИХБФМ СО РАН.

Структурные характеристики и противоопухолевая активность *in vitro* полисахаридов бурой водоросли *Alaria ochotensis*

Суриц В.В. *, Усольцева Р.В., Зуева А.О., Шевченко Н.М., Ермакова С.П.

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

Бурые водоросли – морские организмы, населяющие прибрежные районы по всему миру. Помимо своей питательной ценности, бурые водоросли содержат много биологически активных соединений с фармацевтическим потенциалом. Среди них полисахариды, которые обладают широким спектром биологической активности. *Alaria* – род ламинариевых бурых водорослей, насчитывающий 18 таксономически признанных видов. Изучение полисахаридного состава было проведено лишь у нескольких из них. Так, из *Alaria angusta* и *Alaria marginata* было выделено по одной фракции ламинарана (1,3;1,6-β-D-глюкан) и по три фракции фукоидана. Ламинараны из *A. angusta* и *A. marginata* имели соотношение связей 1,3:1,6 = 10:1 и 5:1 соответственно. Первые две фракции представляли собой сульфатированные гетерополисахариды, а третьи фракции являлись галактофуканами [1, 2].

Целью данной работы было получение полисахаридов из бурой водоросли *Alaria ochotensis*, а также исследование их строения и противоопухолевого действия.

Для выделения полисахаридов из *A. ochotensis* были проведены последовательные экстракции этанолом и 0,1 М соляной кислотой. Для разделения полученных полисахаридов использовали гидрофобную (Полихром-1) и анионообменную (DEAE Масго-Преп) хроматографии. Получены высокоочищенные фракции полисахаридов AoL, AoF1, AoF2, AoF3 с выходами 0,6; 0,41; 1,85; 2,2% от веса сухой обезжиренной водоросли. Исследованы структурные характеристики выделенных полисахаридов. Ламинаран AoL представляет собой 1,3;1,6-β-D-глюкан с соотношением связей 1,3:1,6 = 22:1; фукоиданы AoF1 – низкосульфатированный (4%) гетерогенный полисахарид; AoF2 – среднесульфатированный (21%) и ацетилированный галактофукан с соотношением фукозы и галактозы 3,5:1; AoF3 – высокосульфатированный (34%) и ацетилированный фукогалактан с соотношением фукозы и галактозы 1:3,5. Исследовано строение фукогалактана AoF3: проведены дезацетилирование, десульфатирование (получено производное AoF3dAdS) и метилирование. Структура AoF3dAdS исследована с помощью спектроскопии ЯМР (¹H, ¹³C, COSY, TOCSY и HSQC). Установлено, что производное AoF3dAdS содержит преимущественно 1,3- и 1,4-связанные остатки галактозы и 1,3-связанные остатки фукозы. 1,4,6-связанные остатки галактозы, а также 1,2,3-/1,2,4-связанные и 1,3,4-связанные остатки фукозы могут быть «точками ветвления». Также были идентифицированы небольшие количества 1,4-связанных остатков фукозы и 1,6-, 1,3,4- и 1,3,6-связанных остатков галактозы. Таким образом, показано, что фукогалактан AoF3 имеет сложную разветвленную структуру. Изучено противоопухолевое действие фукогалактана AoF3 *in vitro* по отношению к клеткам меланомы человека SK-MEL-28 и клеткам карциномы толстого кишечника человека DLD-1. Показано, что фукогалактан AoF3 (200 мкг/мл) усиливает действие ингибитора гликолиза 2-дезоксиглюкозы (2-DG), что делает его перспективным для создания биологически активных добавок.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-14-00321.

Ссылки:

1. 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*. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *132*, 118–125.
2. 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*. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *153*, 258–265

Идентификация клеточных белков-участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1

Щигал О.Е.^{1,*}, Анисенко А.Н.¹, Зиганшин Р.Х.², Готтих М.Б.¹

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

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

*olga.stchigal@gmail.com

Интеграция генома вируса иммунодефицита человека 1-ого типа (ВИЧ-1) в геном клетки-хозяина приводит к возникновению повреждений ДНК, а именно, пятинуклеотидных односторонних разрывов в клеточной ДНК по краям от вирусной, а также неспаренных динуклеотидов на 5'-концах вирусной ДНК. Успешная репликация вируса возможна только после устранения этих повреждений в ходе постинтеграционной репарации (ПИР). Ранее считалось, что ПИР осуществляется исключительно клеточными системами репарации, и вирусные белки не регулируют этот процесс. Было известно об участии в этом процессе некоторых факторов репарации двухцепочечных разрывов, однако механизм репарации остается непонятен в силу отсутствия двухцепочечных разрывов ДНК при интеграции вируса [1]. Некоторые данные, в том числе полученные в нашей лаборатории, говорят о важной роли вирусной интегразы в ПИР. Интегразы, взаимодействуя с Ku70 компонентом DNA-РК комплекса, привлекает к местам повреждений ДНК факторы репарации [2], например, DNA-РКcs и АТМ, фосфорилирующая активность которых важна для ПИР [3]. Поэтому данная работа была посвящена выявлению факторов репарации и других клеточных белков, фосфорилирующихся в ходе этого процесса, важных для эффективной репликации ВИЧ-1. Для достижения поставленной цели использовали две стратегии: 1) Идентификация клеточных белков, фосфорилирующихся в ходе ПИР; 2) Оценка влияния нокаута генов из систем репарации ДНК на репликацию ВИЧ-1. В результате реализации первой стратегии был получен список дифференциально-фосфорилированных клеточных белков, фосфорилирование которых возрастает спустя 14 ч после трансдукции клетки ВИЧ-1; установлены взаимодействия между исследуемыми белками, определены обогащенные функциональные группы белков; выявлено, что в ходе ранних этапов репликации ВИЧ-1 активно фосфорилируется широкий спектр факторов репарации двухцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов и пути рекомбинации. В рамках второй стратегии на основе клеток НЕК293Т получена библиотека нокаутов по генам из систем репарации ДНК; отобраны клетки, в которых псевдовирс на основе генома ВИЧ-1 эффективно проходит ранние этапы репликации, включая ПИР; проведено выделение геномной ДНК из таких клеток и общего пула клеток библиотеки, амплификация участков, кодирующих гидовые РНК, определение последовательностей, их анализ и сравнение с контролем, что позволило выявить гены систем репарации ДНК, нокаут которых негативно влияет на ранние этапы репликации ВИЧ-1. Проведен сравнительный анализ данных из первого и второго пункта. На основе полученных результатов сделаны выводы об участии белков из клеточных систем репарации в постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-10021.

Ссылки:

1. Skalka, A. M.; Katz, R. A. Retroviral DNA Integration and the DNA Damage Response. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 971–978.
2. Knyazhanskaya, E. et al. NHEJ Pathway Is Involved in Post-Integrational DNA Repair Due to Ku70 Binding to HIV-1 Integrase. *Retrovirology* **2019**, *16*, 30.
3. Anisenko, A.; Nefedova, A.; Agapkina, Y.; Gottikh, M. Both ATM and DNA-PK Are the Main Regulators of HIV-1 Post-Integrational DNA Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2797. <https://doi.org/10.3390/ijms24032797>.

Структурная характеристика капсульного полисахарида морской бактерии *Cobetia* sp. КММ 1376[†]

Пигуль Е.С.^{1,*}, Романенко Л.А.², Кокоулин М.С.²

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

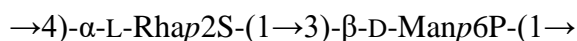
²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

*pigulekaterina0@gmail.com

Мировой океан — самый обширный и наименее изученный биотоп на планете Земля, где граммотрицательные бактерии являются неотъемлемым компонентом и представляют значительную часть микробных сообществ. Специфические условия обитания морских микроорганизмов сформировали у них ряд приспособительных особенностей, в том числе, изменения коснулись и биополимеров, ассоциированных с клеточной поверхностью бактерий, которые играют определяющую роль во взаимодействии микроорганизмов с окружающей средой. Бактериальные внеклеточные полисахариды обычно встречаются в двух формах: в виде капсульных полисахаридов (КПС), если они связаны с клеточной поверхностью, и полисахаридов, высвобождающихся в окружающую среду (экзополисахариды, ЭПС). Эти биополимеры обладают специфическими свойствами и функциями, которые полезны и необходимы для микроорганизмов. Повышенный интерес к этим уникальным по структуре и свойствам соединениям объясняется наличием у них широкого спектра фармакологических свойств. В связи с неугасающим интересом к новым возобновляемым источникам биополимеров полисахариды морских бактерий становятся важной областью исследований и демонстрируют огромные перспективы развития.

В ходе изучения различных изолятов бактерий рода *Cobetia* (семейство *Halomonadaceae*) было показано, что большинство штаммов продуцируют сульфатированные полисахариды, которые, как известно, обладают потенциальными антипролиферативными свойствами.

В качестве объекта исследования был выбран микроорганизм из Коллекции Морских Микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН *Cobetia* sp. КММ 1449. Штамм был изолирован из образцов донных отложений, собранных в прибрежной зоне Японского моря. КПС был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией солевым раствором с последующей ферментативной обработкой. Полученный КПС был дополнительно очищен с помощью гидрофобной хроматографии, анионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Анализ методом эксклюзионной хроматографии показал, что КПС формирует единственный симметричный пик с молекулярной массой около 202 кДа. ДСН-ПААГ электрофорез КПС с визуализацией красителем на основе толуидинового синего показал широкий мазок в верхней части геля, типичный для отрицательно заряженных полисахаридов. ИК-спектр КПС в сочетании с данными турбидиметрического анализа указывали на наличие в составе КПС сульфатных групп. Моносахаридный анализ КПС методами ГЖХ и ГЖХ-МС в виде ацетилированных полиолов, метил- и 2-(S)-октилгликозидов свидетельствовал о наличии в составе полисахарида в качестве основных остатков L-рамнозы (L-Rha) и D-маннозы (D-Man). Исследование КПС с помощью метода спектроскопии ЯМР на ядрах ¹H, ¹³C и ³¹P, включая двумерные COSY, TOCSY, HSQC и HMBC эксперименты, позволило установить следующую структуру линейного повторяющегося звена полисахарида:



Исследование выполнено при финансовой поддержке стипендией Президента Российской Федерации СП-4729.2022.4.

Синтез тиазол-углеводных конъюгатов на основе тиакарпина, аналога цитотоксического алкалоида из асцидии *Polycarpa aurata*

Ковач С.М.^{1,2,*}, Баланева Н.Н.¹, Борисова К.Л.¹, Сабуцкий Ю.Е.¹, Пелагеев Д.Н.¹

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

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*svetakovach596403@gmail.com

Морские организмы привлекают большое внимание исследователей как источники новых соединений, обладающих биологической активностью. Одно из таких соединений - алкалоид поликарпин (Рисунок 1) был выделен из асцидии *Polycarpa aurata*. Поликарпин и его аналоги продемонстрировали высокую противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* в отношении мышины лейкемии, лейкоза и карциномы Эрлиха, также была установлена их противовирусная активность [1, 2].

В данной работе был синтезирован ряд ацетилированных **4**, **5** и дезацетилированных **6**, **7** тиазол-углеводных конъюгатов на основе производных тиакарпина **2a-e** и галогенированных производных глюкозы **3a,b** и ксилозы **3c** (Рисунок 1) для дальнейшего изучения противомикробной, противоопухолевой и противовирусной активностей.

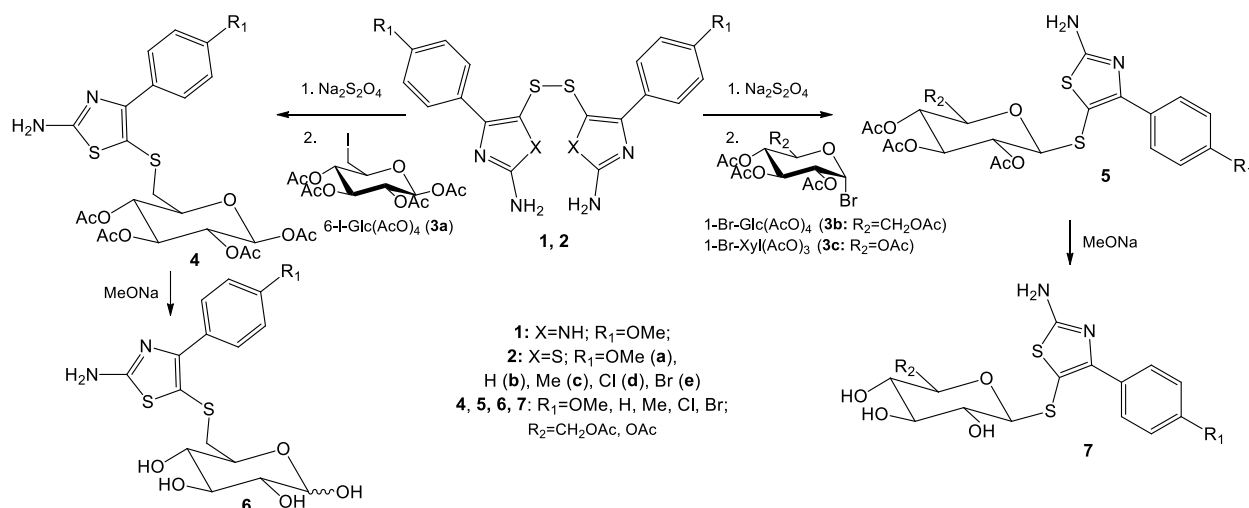


Рисунок 1. Структурные формулы поликарпина (**1**), тиакарпина (**2a**) и схема синтеза тиазол-углеводных конъюгатов (**4-7**)

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 23-23-00357.

Ссылки:

- Radchenko, O.S.; Novikov, V.L.; Willis, R.H.; Murphy P.T.; Elyakov, G.B. Synthesis of polycarpine, a cytotoxic sulfur-containing alkaloid from the ascidian *Polycarpa aurata*, and related compounds. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3581-3584.
- Guo, P.; Wang, Z.; Li, G.; Liu, Y.; Xie, Y.; Wang, Q. First Discovery of Polycarpine, Polycarpaurines A and C, and Their Derivatives as Novel Antiviral and Antiphytopathogenic Fungus Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4264-4272.

Ультраструктурная организация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с увеличенным числом CAG повторов в гене хантингтина, используемых для создания клеточных моделей болезни Хантингтона

Сульдина Л.А.^{1,*}, Морозова К.Н.^{1,2}, Малахова А.А.¹, Лагарькова М.А.³, Киселева Е.В.¹

¹Институт Цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

²Новосибирский национальный исследовательский университет, Новосибирск

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М.

Лопухина ФМБА, Москва

*suldinalubov@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) – наследственное нейродегенеративное заболевание, вызванное увеличением числа CAG повторов в гене белка хантингтина (*HTT*), что приводит к нарушению структуры белка Htt и его агрегации [1]. БХ является одним из широко изучаемых нейродегенеративных заболеваний, а наиболее удобным объектом для исследования её патогенеза являются клеточные культуры нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. Однако изменения в плюрипотентных клетках с этой мутацией исследованы слабо, хотя известно, что Htt играет важную роль в эмбриональном развитии [2], и таким образом влияние мутации может проявляться уже в эмбриональных клетках. В своей работе мы исследовали ультраструктурную организацию ИПСК, полученных из фибробластов кожи пациентов с БХ (42 и 47 CAG повторов) и из эмбриональных фибробластов, в ген *HTT* которых увеличенное число CAG повторов (до 69) было внесено с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. В качестве контроля использовались эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и ИПСК здорового донора, а также ИПСК, полученные из исходной линии эмбриональных фибробластов. Как клетки контрольных линий, так и несущие увеличенное число CAG повторов, демонстрировали типичную морфологию плюрипотентных клеток. Они росли в крупных многослойных плотных колониях неправильной формы. Клетки имели округлую форму, крупные ядра с 1-2 гранулярными ядрышками, демонстрировали высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Цитоплазма была заполнена полисомами и обеднена мембранными органеллами. Митохондрии, часто округлые или овальные, группировались вблизи ядра. Наблюдалось скопление гликогена в виде обширных светлых пространств в цитоплазме свободной от органелл. В пациент-специфичных ИПСК эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и аппарат Гольджи (АГ) были развиты сильнее, чем в контроле, и формировали множество везикул. Заметно увеличивалось количество аутолизосом в цитоплазме. ИПСК, полученные из фибробластов с трансгенной встройкой 69 CAG повторов отличались от соответствующего контроля более заметно, чем пациент-специфичные. Заполненность цитоплазмы органеллами была выше, чем в контроле. Митохондрии в этих клетках часто имели нарушения оболочки и контактировали с ЭПР, который был представлен как цистернами, так и сетчатыми структурами и был окружен множеством мелких везикул. Количество аутолизосом в этих клетках заметно возрастало. Таким образом, было продемонстрировано, что при увеличении числа CAG повторов в гене *HTT* нарушения структурной организации проявляются даже в плюрипотентных стволовых клетках и чем больше повторов, тем более выражены эти нарушения.

Работа поддержана бюджетным проектом FWNR-2022-0015

Ссылки:

1. Folger A.; Wang Y. The Cytotoxicity and Clearance of Mutant Huntingtin and Other Misfolded Proteins. *Cells* **2021**, *10*, 2835.
2. Reiner, A.; Dragatsis, I.; Zeitlin, S.; Goldowitz, D. Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Molecular neurobiology* **2003**, *28*, 259-275.

Исследование гидролаз бактериофагов, инфицирующих патогены сои рода *Curtobacterium*

Лукьянова А.А.^{1,*}, Асеведо-Солис П.А.^{1,2}, Комаревцев С.К.¹, Евсеев П.В.¹, Мирошников К.А.¹
¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва

²Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва

*a.al.lukianova@gmail.com

Ржаво-бурая пятнистость – это заболевание зернобобовых растений, вызываемое бактерией *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Патоген развивается в сосудистой системе растения, вызывая отмирание листьев и увядание. В результате инфекции растение погибает, либо существенно снижается его урожайность [1]. Данный патоген включен в карантинный список Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) [2]. В РФ также отмечены случаи распространения ржаво-бурой пятнистости [3]. Однако, в РФ Cff не относится к карантинным патогенам, а потому может свободно распространяться. Борьба с ржаво-бурой пятнистостью в основном подразумевает ряд мер, направленных на профилактику распространения инфекции. Поскольку основным путем распространения являются зараженные семена, ЕОЗКР рекомендует сертификацию семян и выбраковку зараженных партий [4]. Никаких эффективных способов обработки посевного материала, которые могли бы защитить от заражения или остановить развитие инфекции, в настоящее время не существует.

Нами был выделен впервые ряд близкородственных бактериофагов, проявляющих литическую активность в отношении Cff и показано их протективное действие на растениях фасоли и сои даже в условиях высокого инфекционного фона. Все выделенные фаги обладали схожим инфекционным спектром и лизировали лишь часть выделенных на территории РФ штаммов Cff. Резистентные к фагу *Ayka* штаммы могут быть чувствительны к рекомбинантным гидролазам бактериофагов. В том числе, можно использовать рекомбинантные гидролазы умеренных фагов. Для поиска кодируемых такими фагами литических ферментов был проведен поиск профаговых последовательностей во всех опубликованных геномах *Curtobacterium*, в результате чего было найдено 64 интактных профаговых генома. Аннотация выделенных геномов позволила выявить открытые рамки считывания, кодирующие ферменты с гидролазной активностью относительно бактериального пептидогликана. Гидролазы, кодируемые профагами, найденными в штаммах Ac1376, Ac2861, Ac2884 были успешно клонированы в вектор pEE3 и получены в растворимой форме. Комплексный препарат этих ферментов может стать эффективным средством в борьбе с ржаво-бурой пятнистостью.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №21-16-00047.

Ссылки:

1. Osdaghi, E.; Young, A. J.; Harveson, R. M. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular plant pathology*, **2020**, 21(5), 605-621.
2. EPPO, EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests, **2022**.
3. Tarakanov, R. I., Lukianova, A. A., Pilik, R. I., Evseev, P. V., Miroshnikov, K. A., Dzhililov, F. S. U., ...& Ignatov, A. N. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing bacterial tan spot of soybean in Russia. *Plant Disease*, **2023** PDIS-08.
4. EPPO, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *EPPO Bulletin*, **2011**, 41, 320– 328.

Создание полноразмерного репликона коронавируса SARS-CoV-2 для безопасного тестирования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса

Стринкевич А.А.^{1,*}, Королев С.П.^{2,3}, Галкин С.О.¹, Анисенко А.Н.^{1,2,3}, Хандажинская А.Л.⁴,
Готтих М.Б.^{2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва

⁴Институт молекулярной биологии РАН им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва

* a192sma1@gmail.com

Заболевание COVID-19 (COronaVirus Disease 2019), вызванное новым штаммом бетакоронавируса SARS-CoV-2, унесло жизни почти 7 млн человек по всему миру. Для терапии COVID-19 к настоящему времени создан только 1 специфический препарат «Паксловид», являющийся ингибитором основной протеазы вируса. Применяющиеся для лечения коронавирусной инфекции препараты ремдесивир, фавипиравир и некоторые другие, направленные на блокирование РНК-полимеразы SARS-CoV-2, не являются специфическими ингибиторами этого фермента и имеют существенное побочное действие. В связи с этим дизайн и синтез специфических ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы SARS-CoV-2 (РЗПИ) представляется совершенно необходимым.

В рамках данной работы была протестирована серия нуклеозидных производных в качестве потенциальных ингибиторов РЗПИ SARS-CoV-2. Тестирование проводилось на созданном нами полноразмерном репликоне вируса, включающем гены всех неструктурных белков SARS-CoV-2 (NSP1-16), а также ген белка N. В репликоне также присутствуют два блока репортерных генов: в результате первого раунда транскрипции синтезируется только первый блок белков-репортеров (Renilla luciferase-GFP), тогда как второй блок (Firefly luciferase-RFP) образуется только в результате протекания прерывистой транскрипции, характерной для представителей семейства *Coronaviridae*. Наличие двух блоков репортерных генов позволяет изучать разные этапы вирусной транскрипции и является основным отличием данного репликона от уже существующих. В качестве вектора для репликона было решено использовать искусственную бактериальную хромосому, поскольку такой тип вектора позволяет получать генетические конструкции достаточно большого размера, содержащие токсичные для *E. coli* последовательности.

Скрининг активности соединений проводился на клеточных линиях Vero E6 и созданной нами Vero E6-ТК, в которой стабильно экспрессируется тимидин-киназа вируса простого герпеса человека первого типа (ТК). Наличие ТК в клетках обеспечивает первый акт фосфорилирования исследуемых соединений, что позволяет обойтись без создания депо-форм для тестируемых нуклеозидных ингибиторов.

В результате тестирования серии из 20 нуклеозидных производных удалось отобрать несколько соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к полимеразной активности РНК-зависимой РНК полимеразы SARS-CoV-2. Необходимо отметить, что часть из исследованных веществ (3'-аминотимидин, зидовудин и ацикловир) проявляли активность только на линии Vero E6-ТК, тогда как другая группа (2'-аминоаденозин, аденозин-N1-оксид и молнупиравир) оказывала ингибирующее действие вне зависимости от наличия ТК.

Работа поддержана специальной программой Министерства образования и науки РФ.

Хлорины тихоокеанских офиур *Ophiura sarsii* и *Ophiura ooplax* проявляют высокую фототоксичность в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы человека

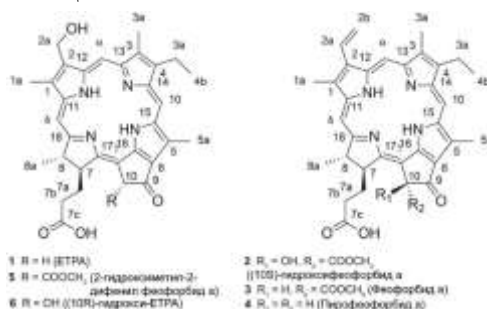
Клименко А.М.*

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

*klimenko.am@dvfu.ru

В последнее десятилетие активно развивается такое направление противоопухолевого лечения как фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ включает в себя системное или местное введение не токсичной дозы фотосенсибилизатора (ФС), а затем облучение опухоли светом. Под воздействием света ФС переходит в возбуждённое состояние и взаимодействуя с молекулярным кислородом генерирует активные формы кислорода (АФК), накопление которых ведёт к гибели опухолевых клеток [1]. Сегодня тетрапиррольные соединения, такие как хлорины, вызывают большой интерес в качестве ФС. Хотя хлорины широко распространены в природе, ранее считалось, что они отсутствуют в классе Ophiuroidea. Однако недавно у вида *Ophiura sarsii* был обнаружен хлорин ЕТРА с высокой фотодинамической активностью [2,3].

Для поиска аналогичных соединений во время экспедиции ННЦМБ ДВО РАН на судне "Академик М. А. Лаврентьев" к подводным горам Императорского Хребта Тихого океана был выполнен сбор офиур *Ophiura ooplax*. Анализ экстрактов и выделение веществ проводились с использованием метода ВЭЖХ-ELSD-УФ-МС на колонке C18 с градиентом MeCN и H₂O в качестве элюентов. В результате было выделено 6 соединений хлоринов (Рисунок 1). Их структуры подтверждали с помощью ЯМР и МСВР.

Рисунок 1. Структура хлоринов *Ophiura sarsii* и *Ophiura ooplax*

Фототоксичность хлоринов в отношении клеток рака молочной железы человека BT-20 проводили методом МТТ. Раковые клетки высевали в 384-луночный планшет и оставляли на ночь для прикрепления. Хлорины в среде DMEM добавляли к клеткам серией разведений начиная от 20 мкг/мл, инкубировали 2 часа, потом культуральную среду заменяли на прозрачный DPBS и освещали светодиодной лампой с красным светом (730-870 нм). Доза света за 30 минут освещения составила 25 Дж/см². Все выделенные соединения проявили высокую фототоксичность с IC₅₀ в диапазоне 0,9–4,7 мкМ, что свидетельствует об их потенциальной применимости в качестве ФС для ФДТ.

Ссылки:

- Li, X.; Lovell, J.F.; Yoon, J.; Chen, X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2020**, *17*, 657–674.
- Klimenko, A.; Huber, R.; Marcourt, L.; Chardonens, E.; Koval, A.; Khotimchenko, Y.S.; Ferreira Queiroz, E.; Wolfender, J.L.; Katanaev, V.L. A Cytotoxic Porphyrin from North Pacific Brittle Star *Ophiura sarsii*. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 11.
- Klimenko, A.; Rodina, E.E.; Silachev, D.; Begun, M.; Babenko, V.A.; Benditkis, A.S.; Kozlov, A.S.; Krasnovsky, A.A.; Khotimchenko, Y.S.; Katanaev, V.L. Chlorin Endogenous to the North Pacific Brittle Star *Ophiura sarsii* for Photodynamic Therapy Applications in Breast Cancer and Glioblastoma Models. *Biomedicines* **2022**, *10*, 134.

Монанхамид А из морской губки *Monanchora pulchra*

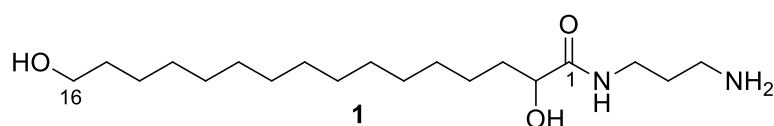
Яроцкая В.В.* , Шубина Л.К., Гузий А.Г., Макарьева Т.Н.

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

*viktori.j@inbox.ru

Губка *Monanchora pulchra* является богатым источником гуанидиновых алкалоидов с разнообразными химическими структурами. Из губок этого вида выделяли ациклические, бициклические [1], трициклические [2], пентациклические [1,3] гуанидиновые алкалоиды. Эти алкалоиды проявляли высокую цитотоксическую активность, индуцировали апоптоз и автофагию в клетках некоторых опухолей, ингибировали TRPV1 рецептор [1-3].

Продолжая наши исследования вторичных метаболитов из губок, мы выделили и установили структуру нового амида α,ω -дигидроксипальмитиновой кислоты, монанхамид А (**1**) из образца № O56-102 губки *M. pulchra*.



Образец губки *M. pulchra* № O56-102 был собран в июне 2019 г на глубине 142 м возле о-ва Уруп (45°52.2 N, 149°37.0 E) с помощью драги во время научного рейса на НИС «Академик Опарин».

Этанольный экстракт *M. pulchra* концентрировали в вакууме, и полученный остаток фракционировали флэш-хроматографией на колонке YMC*Gel ODS-A, элюируя ступенчатым градиентом EtOH:H₂O (20→80%). Фракцию, элюированную 60% EtOH, очищали ВЭЖХ на колонке YMC-Pack ODS-A (250 x 10 мм) со скоростью 1,6 мл/мин в системе EtOH:H₂O (65:35)/0,01% ТФУ. В результате выделили монанхамид А (1,5 мг).

Структура монанхамид А (**1**) была установлена на основании анализа 1D и 2D ЯМР спектров и масс-спектров высокого разрешения с ионизацией электрораспылением.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант 23-14-00040.

Ссылки:

1. El-Demerdash, A.; Atanasov, A.G.; Bishayee, A.; Abdel-Mogib, M.; Hooper, J.N.A.; Al-Mourabit, A. *Batzella, Crambe and Monanchora: Highly Prolific Marine Sponge Genera Yielding Compounds with Potential Applications for Cancer and Other Therapeutic Areas. Nutrients* **2018**, *10*, 33.
2. Dyshlovoy, S.A.; Shubina, L.K.; Makarieva, T.N.; Guzii, A.G.; Hauschild, J.; Strewinsky, N.; Berdyshev, D.V.; Kudryashova, E.K.; Menshov, A.S.; Popov, R.S.; Dmitrenok, P.S.; Graefen, M.; Bokemeyer, C.; von Amsberg, G. New Guanidine Alkaloids Batzelladines O and P from the Marine Sponge *Monanchora pulchra* Induce Apoptosis and Autophagy in Prostate Cancer Cells. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 738.
3. 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*. *Organic Letters* **2010**, *12*, 4292-4295.

Исследование полярных стероидных метаболитов из дальневосточных морских звезд *Henricia* sp.

Толканов Д.К. *, Калиновский А.И., Попов Р.С., Кича А.А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
*aspid2601042@gmail.com

Морские звезды привлекают внимание исследователей большим разнообразием высокоокисленных (полярных) стероидных соединений с уникальными структурами, которые значительно отличаются от стероидных метаболитов наземного происхождения. По своей химической структуре полярные стероиды морских звезд можно разделить на полигидроксистероиды, включающие до девяти гидроксильных групп, моно- и биозиды (иногда триозиды) полигидроксистероидов, астеросапонины, являющиеся стероидными олигогликозидами, содержащими до шести моносахаридных остатков, и редкие циклические стероидные гликозиды с углеводными цепями из трех моносахаридов, образующих цикл со стероидным агликоном. Интерес к стероидным метаболитам морских звезд объясняется также их широким спектром физиологического действия, включая нейритогенную, противогрибковую, противоопухолевую, противовоспалительную и другие виды активности.

Целью представленной работы было выделение и исследование строения полярных стероидных соединений из дальневосточной морской звезды *Henricia* sp., собранной в районе Курильских островов (Охотское море). Была проведена экстракция животного материала и разделение суммарной фракции полярных стероидов с помощью колоночной хроматографии на различных сорбентах (полихром-1, сефадекс LH-20, силикагель, флорисил) на отдельные подфракции. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазных сорбентах из этих подфракций были выделены два индивидуальных соединения (**1**, **2**). Химическое строение этих соединений было определено одномерной ЯМР спектроскопией на ядрах ^1H и ^{13}C , DEPT, 1D TOCSY, двумерной ЯМР спектроскопией с применением методов ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC и ROESY, а также масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС) и tandemной масс-спектрометрией (ИЭР МС/МС). Установили, что оба соединения содержат по два моносахаридных остатка, то есть являются биозидами, причем один моносахаридный остаток присоединен к стероидному ядру, а второй – к боковой цепи агликона. Кроме того, определили, что стероидные агликоны гликозидов **1** и **2** отличаются друг от друга. Гликозид **1** имеет гексагидроксихолестановый агликон, а гликозид **2** включает пентагидроксихолестановый агликон. Кислотный гидролиз гликозида **1** с последующей ГЖХ ацетатов октилгликозидов моносахаридов с соответствующими стандартными образцами показали, что в гликозиде **1** присутствуют остатки 2,4-ди-*O*-метил-*D*-ксилозы и *L*-арабинозы. Установление конфигурации асимметрических центров в выделенных соединениях будет продолжено.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-44-10009.

Анксиолитическое, анальгезирующее и противовоспалительное действие модуляторов кислоточувствительных ионных каналов из морской анемоны *Heteractis magnifica*

Кожевникова Ю.В.^{*}, Климович А.А., Калина Р.С., Гладких И.Н., Лейченко Е.В.
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
^{*}yliya77ya@mail.ru

Кислоточувствительные ионные каналы (ASICs), реагируя на изменение pH, участвуют в генерации ноцицептивного сигнала при неврологических, воспалительных заболеваниях и болевом синдроме. Модуляторы ASICs могут быть потенциальными нейропротекторными, обезболивающими и противовоспалительными средствами [1]. В данной работе мы показали, что два токсина-модулятора ASIC1a и ASIC3 каналов морской анемоны *Heteractis magnifica* [2], Hmg 1b-2 и Hmg 1b-4, проявляют анксиолитическую, противовоспалительную и анальгетическую активность *in vivo* при внутривенном введении мышам линии CD-1 [3].

Для исключения возможного нейротропного эффекта и для оценки влияния пептидов на двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность мышей были проведены поведенческие тесты «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Показано, что оба пептида значительно увеличивают время активности животных, но 1b-2 превосходит 1b-4 по пройденному расстоянию и скорости движения животных. При этом оба пептида достоверно повышают исследовательскую активность мышей. Полученные данные свидетельствуют о том, что 1b-2 оказывает возбуждающее действие на центральную нервную систему, а 1b-4 обладает анксиолитической активностью.

Для оценки анальгетической активности пептидов использовали тест, который основан на соматосенсорной реакции (корча), вызванной раздражением серозных оболочек 0,7% раствором уксусной кислоты. Показано, что 1b-2 и 1b-4 оказывают анальгетическое действие при ацидозе тканей, достоверно снижая количество и продолжительность корчей, подобно нестероидному противовоспалительному препарату «Диклофенак».

Противовоспалительную активность пептидов оценивали с использованием моделей острого местного воспаления, индуцированного λ -каррагинаном и полным адьювантом Фрейнда. Показано, что 1b-4 оказывает более выраженное и статистически значимое противовоспалительное действие, чем Hmg 1b-2. Он превосходит действие «Диклофенака» и в дозе 0,1 мг/кг уменьшает объем лапы почти до исходного объема.

Исследования выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00912, <https://rscf.ru/project/22-24-00912/>.

Ссылки:

1. Eisenhut, M.; Wallace, H. Ion channels in inflammation. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2011**, 461, 401–421.
2. Kalina, R.S.; Koshelev, S.G.; Zelepuga, E.A.; Kim, N.Y.; Kozlov, S.A.; Kozlovskaya, E.P.; Monastyrnaya, M.M.; Gladkikh, I.N. APETx-like peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, diverse in their effect on ASIC1a and ASIC3 ion channels. *Toxins* **2020**, 12, 266.
3. Gladkikh, I.N.; Klimovich, A.A.; Kalina, R.S.; Kozhevnikova, Y.V.; Khasanov, T.A.; Osmakov, D.I.; Koshelev, S.G.; Monastyrnaya, M.M.; Andreev, Y.A.; Leychenko, E.V.; Kozlov, S.A. Anxiolytic, analgesic and anti-inflammatory effects of peptides Hmg 1b-2 and Hmg 1b-4 from the sea anemone *Heteractis magnifica*. *Toxins* **2023**, 15, 341.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агафонова И.Г.	86	Горбунова Е.А.	68
Адолина С.Н.	30, 38, 63	Готтих М.Б.	92, 97
Айсин К.Н.	64	Грабовец И.П.	35
Александрова Ю.И.	58	Гузий А.Г.	99
Аминин Д.Л.	86	Деев С.М.	13
Андреев Я.А.	15	Демидов О.Н.	12
Анисенко А.Н.	92, 97	Держалова А.Ш.	24, 87
Ануфриев В.Ф.	77	Дзюба С.А.	71
Аралов А.В.	48	Дианов Д.В.	36
Арефьева А.Б.	74, 75	Дивейкина А.А.	40
Арчаков А.И.	53	Дмитренко П.С.	20, 49, 66
Асеведо-Солис П.А.	96	Довгань В.В.	84
Бабкин И.В.	88	Долгова Е.В.	32
Базовкина Д.В.	30, 38, 63, 75	Донцова О.А.	60
Байков И.К.	17, 69	Дорошков А.В.	59
Байкова О.Ю.	46	Друцкая М.С.	16
Баланева Н.Н.	94	Дубашинская Н.В.	26
Баранов Д.С.	70	Дьяченко И.А.	50
Барановский А.В.	62	Евсеев П.В.	96
Басина В.П.	33	Евсюкова В.С.	75
Бауман Ю.И.	57	Еремеева Т.П.	46
Бердышев Д.В.	61	Ермак И.М.	78
Бизяев С.Н.	24, 43, 87	Ермакова С.П.	85, 89, 91
Бирюков М.М.	68	Ершова М.О.	53, 55
Биченкова Е.В.	67	Ефремов Р.Г.	56
Богачев С.С.	32	Ефремов Я.Р.	32
Боголюбова А.В.	36	Жильникова М.В.	34
Бондарь Н.П.	73	Закирова А.Е.	77
Борисова К.Л.	94	Закревский Д.Э.	68
Боркунов Г.В.	51	Захрямина А.Е.	43
Бороздина Н.А.	50	Зеленихин П.В.	58
Буракова Е.А.	24, 43, 87	Зелепуга Е.А.	29
Варакса Т.С.	35	Зенкова М.А.	39, 67
Ведягин А.А.	57	Зиганшин Р.Х.	92
Веселова В.О.	81	Зуева А.О.	91
Власов В.В.	67	Иванов А.С.	22, 29, 31, 33, 62, 86
Волковинская А.И.	88	Иванов Ю.Д.	53, 55
Володько А.В.	78	Иванова И.А.	53
Волынкина И.А.	60	Иванова Н.О.	36
Гайтко О.М.	81	Иванова О.Е.	46
Галкин С.О.	97	Иванчина Н.В.	29, 63, 66
Гапонова С.К.	67	Изъюров А.Е.	74
Гилеп А.А.	21, 29, 33, 35, 62, 66	Имамутдинова А.Н.	60
Гладких И.Н.	49, 50, 54, 56, 101	Исмангулова Д.Ю.	40
Гнеденко О.В.	29, 33	Иунихина О.В.	61
Голосова Н.Н.	90	Ищук С.А.	45

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

Казакова А.В.	45	Лихацкая Г.Н.	86
Калина Р.С.	49, 101	Лузина О.А.	40, 42
Калиновский А.И.	100	Лукьянов Д.А.	60
Калужский Л.А.	29, 31, 62, 66, 86	Лукьянова А.А.	97
Камзеева П.Н.	48	Макарьева Т.Н.	66, 99
Капустина И.И.	66	Малахова А.А.	95
Карпова Е.В.	46	Манжуло И.В.	86
Карпуть Е.Ю.	66	Маренина М.К.	42
Кашеверов И.Е.	23	Марков А.В.	39
Кашник А.С.	70	Марьясина С.С.	64
Кветкина А.Н.	49, 52	Матвеев А.Л.	82, 90
Кисаретова П.Э.	73	Маханьков В.В.	77
Киселева Е.В.	59, 95	Мезенцев Ю.В.	33
Кича А.А.	29, 62, 66, 100	Мензоров А.Г.	59
Клабенкова К.В.	24, 43	Менчинская Е.С.	86
Клименко А.М.	98	Меньшов А.С.	54
Климович А.А.	49, 50, 101	Мешкова Ю.В.	42
Коваль О.А.	34, 68	Мизгина Т.О.	79
Ковач С.М.	94	Милахина Е.В.	68
Кожевникова Ю.В.	49, 101	Мирошников К.А.	96
Кожемякина Р.В.	76	Михайлова Е.Е.	17, 69
Козлов С.А.	49	Мишаков И.В.	57
Козлова Ю.Н.	90	Морозов В.В.	83
Козловская Л.И.	44, 46, 48	Морозова В.В.	17, 90
Козловская Э.П.	29	Морозова К.Н.	59, 95
Козловский С.А.	86	Москалюк В.С.	63, 76
Кокоулин М.С.	93	Мустафина А.Н.-И.	46
Колесникова Т.Д.	84	Назмутдинова В.А.	58
Колпакова Е.С.	48	Найданова М.А.	73
Комаревцев С.К.	96	Науменко В.С.	72, 76
Комарова А.А.	37	Науменко Л.Г.	59
Комлева П.Д.	74	Никандрова А.А.	60
Королев С.П.	97	Одаренко К.В.	39
Королёва П.И.	71	Остерман И.А.	60
Кошелев С.Г.	49	Ошихмина С.Г.	32
Кравчук Б.И.	82	Павленко А.П.	52
Краснова Е.И.	82	Панина Е.А.	88
Крылова Н.В.	61	Панина И.С.	56
Кряквин М.А.	60	Парамонов А.С.	54
Крячкова Н.В.	68	Патрушев Д.Э.	24
Кудрявцев Д.С.	23, 47	Патутина О.А.	67
Куликов А.В.	74, 75	Пелагеев Д.Н.	94
Куликова Е.А.	38, 63, 75, 76	Пигуль Е.С.	93
Курченко О.М.	17	Пислягин Е.А.	86
Кусайкин М.И.	50, 89	Плешакова Т.О.	53, 55
Лагарькова М.А.	95	Полоник С.Г.	86
Лейченко Е.В.	49, 50, 52, 54, 56, 101	Польшаков В.И.	64
Лещенко Е.В.	51	Полякова А.А.	68

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

Попкова Д.В.	50, 54	Филиппова А.Д.	81
Попов А.А.	57	Фокина А.А.	24, 87
Попов Р.С.	51, 77, 100	Хандажинская А.Л.	97
Потылицына А.Р.	57	Хвостов М.В.	42
Похолкова Г.В.	84	Хейман Т.	67
Прасолов В.С.	18	Хлусевич Я.А.	82
Расин А.Б.	89	Хоцкин Н.В.	72, 74
Риттер Г.С.	41	Хоцкина А.С.	74
Рогожин Е.А.	49	Худякова Ю.В.	51
Романенко Л.А.	93	Цыбко А.С.	72
Рубцов Н.К.	85	Цыбрук Т.В.,	29, 33, 62
Руднева Ю.В.	57	Черников О.В.	79
Рузанова В.С.	28	Чечушков А.В.	83
Сабуцкий Ю.Е.	86, 94	Чжихуэй Г.	24, 87
Салахутдинов Н.Ф.	39, 40	Чиглинцева Д.А.	67
Салман Р.	73	Чикаловец И.В.	79
Саломатина О.В.	39	Чингизова Е.А.	86
Сенькова А.В.	67	Чичерина Г.С.	82
Сергиев П.В.	60, 64	Чугунов А.О.	56
Сердюк Я.В.	36	Шайхудинова Э.Р.	50
Сильченко А.С.	85	Швейгерт И.В.	68
Синцова О.В.	50, 54	Шевченко Н.М.	89, 91
Скорик Ю.А.	26	Шенкарев З.О.	54
Скотникова А.К.	30, 38, 63	Шкрабов Р.А.	89
Сон Л.В.	23	Шлык Н.П.	51
Сорокин И.Е.	75	Шрайнер Е.В.	83
Спирин П.В.	65	Шуберт Ф.	84
Стеценко Д.А.	24, 43, 87	Шубин Ю.В.	57
Стойков И.И.	58	Шубина Л.К.	99
Стоник В.А.	11	Шумянцева В.В.	71
Стринкевич А.А.	97	Шурпик Д.Н.	58
Струшкевич Н.В.	35	Шустова Е.Ю.	44, 48
Сульдина Л.А.	59, 95	Щербакова А.И.	72
Суриц В.В.	91	Щигал О.Е.	92
Табакмахер К.Н.	66	Юхтанов Д.А.	59
Тарбеева Д.В.	61	Яблоков Е.О.	29, 31, 33
Тикунов А.Ю.	83, 90	Яковчук Е.В.	44
Тикунова Н.В.	17, 69, 82, 83, 88, 90	Яровая О.И.	42
Толканов Д.К.	100	Яроцкая В.В.	99
Троицкая О.С.	34		
Тумилович А.М.	33		
Усольцева Р.В.	89, 91		
Устинова У.С.	30		
Федореев С.А.	61		
Федорец В.А.	83		
Фефелова Е.И.	36		
Филимонов А.С.	40, 42		
Филимонова Е.С.	82		