



**Сборник тезисов**

**V Всероссийской конференции**

**«Фундаментальная гликобиология»**

**21-24 сентября 2021 г.**

**Гатчина**

## СЕКЦИЯ «Разнообразие природных гликанов и гликоконъюгатов»

### Могут ли олигосахариды, аналогичные по структуре основной цепи, образовывать боковые цепи RG-I?

Головченко В.В.

ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: lemnan@mail.ru

«Пектин» или «пектиновые вещества» - названия группы тесно связанных растительных полисахаридов. Хотя они существуют как набор сложных полисахаридов, выделяют следующие структурные типы: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан-I (RG-I) и замещенные галактуронаны [1].

RG-I представляет собой разветвленный пектиновый полисахарид, содержащий в главной углеводной цепи дигликозильную повторяющуюся единицу со строго чередующейся последовательностью 1,4-связанных остатков D-GalpA и 1,2-связанных остатков L-Rhap [2]. Обычно примерно 50% остатков Rhap замещены боковыми цепями по O-4 [3], но также были идентифицированы RG-I с более низким и более высоким замещением остатков Rhap [4]. Единичные остатки D-Galp, а также олиго- и полимерные цепи, состоящие в основном из остатков L-Araf и D-Galp с различными типами гликозидных связей, идентифицированы в линейных и разветвленных боковых цепях RG-I [5].

Методом спектроскопии ЯМР установлено, что детали структуры пектинов, выделенных водой из листьев березы *Betula pendula*, отличаются от обычно наблюдаемых. Показано, что структурной особенностью исследованных RG-I является значительное содержание невосстанавливающих концевых остатков Rhap и GalpA при отсутствии восстанавливающих концевых единиц. При этом профили элюирования HPSEC растворов полисахаридов свидетельствуют об их гомогенности и высокой молекулярной массе. Отсутствие деградации углеводных цепей в исследованных пектинах подтверждается широкими сигналами в протонных спектрах ЯМР, которые являются характеристикой полимеров, а не олигомеров. Установлено, что невосстанавливающие концевые остатки Rhap и GalpA являются частью ди- и трисахаридных цепей, подобных по структуре главной углеводной цепи RG-I. Мы предполагаем, что локализация таких олигосахаридных структурных единиц в боковых цепях RG-I является единственным объяснением дисбаланса между невосстанавливающими и восстанавливающими концевыми остатками.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-64-47036).

#### Список литературы:

1. Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* (2009). doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z
2. Lau, J. M., McNeil, M., Darvill A. G., Albersheim, P. Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research* (1985). doi.org/10.1016/0008-6215(85)85153-3
3. McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. Structure of Plant Cell Walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology* (1980). doi:10.1104/pp.66.6.1128

4. *Ishii, T., Thomas, J., Darvill, A., Albersheim, P.* Structure of Plant Cell Walls. XXVI. The Walls of Suspension-Cultured Sycamore Cells Contain a Family of Rhamnogalacturonan-I-Like Pectic Polysaccharides. *Plant Physiology* (1989). [doi:10.1104/pp.89.2.421](https://doi.org/10.1104/pp.89.2.421)

5. *Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D.* Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* (2001). [doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)

## Характеристика полисахаридов, экстрагируемых водой из каллусной ткани стебля борщевика сосновского *Heracleum sosnowskyi* Manden

*Гордина Е.Н.<sup>1</sup>, Шашков А.С.<sup>2</sup>, Головченко В.В.<sup>3</sup>, Злобин А.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Вятский государственный университет, 610000, Кировская обл., г. Киров, Россия

<sup>2</sup> Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, г. Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

E-mail: [gordina\\_elenabk@bk.ru](mailto:gordina_elenabk@bk.ru)

Культуры дедифференцированных клеток и тканей растений являются удобными объектами для получения полисахаридов, обладающих определённым спектром биологической активности, обусловленным особенностями состава и структуры их углеводных цепей [1].

Цель данной работы – структурно-химическая характеристика полисахаридов клеточных стенок каллусной ткани стебля борщевика Сосновского, экстрагируемых водой.

Выделение полисахаридов из лиофильно высушенной каллусной ткани проводили последовательной экстракцией дистиллированной водой и 0.7 %-ным водным раствором оксалата аммония. Ранее [2], было установлено, что полисахариды, экстрагируемые из каллуса борщевика раствором оксалата аммония, представлены пектиновыми полисахаридами, которые имеют существенные структурные отличия главных и боковых углеводных цепей от пектиновых полисахаридов нативного растения *H. sosnowskyi* [3].

С помощью методов ионообменной хроматографии, ферментативного гидролиза, периодатного окисления, метилирования и спектроскопии ЯМР показано, что полисахариды, экстрагируемые из каллусной ткани борщевика водой, представлены смесью высокоразветвлённого арабиногалактана II и пектиновых полисахаридов, которые отличаются от полисахаридов клеточных стенок нативного растения более высоким содержанием остатков арабинозы и галактозы [3-5]. Их углеводные цепи содержат терминальные, 1,2-, 1,3-, 1,5-связанные и 3,5-ди-*O*-замещённые остатки арабинофуранозы, терминальные, 1,2-связанные и 2,4-ди-*O*-замещённые остатки рамнопиранозы, а также терминальные, 1,3-, 1,4-, 1,6-связанные и 3,6-ди-*O*-замещённые остатки галактопиранозы.

Полученные данные указывают на то, что арабинаногалактановые углеводные цепи входят в состав разветвлённых областей углеводных цепей пектиновых полисахаридов каллуса борщевика, представленных рамногалактуронамом I, и присоединены к ним по С-4 положению остатков рамнопиранозы.

### Список литературы:

1. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, № 3. – С. 293-310.
2. Гордина Е.Н., Кузнецов С.П., Головченко В.В., Злобин А.А. Предварительная структурная характеристика полисахаридов, экстрагируемых из каллусной ткани стебля борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi* Manden водным раствором оксалата аммония// Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 6. – С. 633-639.
3. Makarova E. N., Shakhmatov E. G., Belyy V. A. Structural characteristics of oxalate-soluble polysaccharides of Sosnowsky's hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden) // Carbohydr. Polym. – 2016. – V. 153. – P. 66-77.

4. Shakhmatov E.G., Atukmaev K.V., Makarova E.N. Structural characteristics of pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Heracleum sosnowskyi* Manden // Carbohydr. Polym. – 2016. – V. 136. – P. 1358-1369.

5. Shakhmatov E.G., Toukach, P.V., Kuznetsov S.P., Makarova E.N. Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *Heracleum sosnowskyi* Manden // Carbohydr. Polym. – 2014. –V. 102. – P. 521-528.

## Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens*: структурные характеристики и биологическое действие

Ермакова С.П.<sup>1</sup>, Маляренко О.С.<sup>1</sup>, Усольцева Р.В.<sup>1</sup>, Шевченко Н.М.<sup>1</sup>, Сильченко А.С.<sup>1</sup>, Кусайкин М.И.<sup>1</sup>, Иванушко Л.А.<sup>2</sup>, Крылова Н.В.<sup>2</sup>, Звягинцева Т.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии им Г.П. Сомова

Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

E-mail: swetlana\_e@mail.ru

Бурая водоросль *Fucus evanescens*, распространенная в дальневосточных морях России, является ценным источником сульфатированных полисахаридов – фукоиданов, обладающих полезной биологической активностью [1].

Показано, что фракция фукоидана FeF из бурой водоросли *F. evanescens* состоит из 1→4- и 1→3-связанных остатков α-L-фукопиранозы, частично ацетилированных и сульфатированных преимущественно по положению C2 и менее по C4. Ацетильные группы занимают свободные положения C3 1,4-связанных остатков и/или C4 1,3-связанных остатков фукозы. Ферментативный гидролиз, слабый кислотный гидролиз и автогидролиз были использованы для определения тонких структурных характеристик фукоидана из *F. evanescens*. В результате ферментативного гидролиза фукоидана FeF была получена фракция FeHMP с регулярной структурой [→3)-α-L-Fucp (2,4SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)-α-L-Fucp (2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→)]<sub>n</sub> [2].

Проведено сравнительное исследование радиосенсибилизирующего [3] и противовирусного [4] действия нативного фукоидана и фукоидана, полученного с помощью ферментативного гидролиза. Показано, что фукоидан FeF и его производное FeHMP способны избирательно повышать чувствительность клеток меланомы человека к радиации. Также оба полисахарида сопоставимы по противовирусной активности в отношении ряда ДНК- и РНК-содержащих вирусов. В докладе будут представлены перспективы изучения действия нативного фукоидана FeF и его производного FeHMP с регулярной структурой как модуляторов биоэнергетических процессов для создания биологически активных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 21-14-00321.

### Список литературы:

1. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarova I.V., Scobun A.S., Luk'yanov P.A., Elyakova L.A. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. (2003). Doi:10.1016/S0022-0981(03)00244-2.

2. Silchenko, A.S., A.B. Rasin, M.I. Kusaykin, O.S. Malyarenko, N.M. Shevchenko, A.O. Zueva, A.I. Kalinovskiy, T.N. Zvyagintseva, and S.P. Ermakova. Carbohydrate Polymers. (2018). Doi:10.1016/j.carbpol.2018.03.04.

3. Malyarenko O. S., Zdobnova E. V., Silchenko A. S., Kusaykin M. I., Ermakova S. P. Carbohydrate Polymers. (2019). Doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.083.

4. Krylova N.V., Ermakova S.P., Lavrov V.F., Leneva I.A., Kompanets G.G., Iunikhina O.V., Nosik M.N., Ebralidze L.K., Falynskova I.N., Silchenko A S., Zaporozhets T.S. Marine Drugs. (2020). Doi:10.3390/md18040224.

**Роль полисахаридов растений и микроорганизмов в формировании бактериальных эмболов в сосудах ксилемы при развитии мягких гнилей**

*Исламов Б.Р.<sup>1,2</sup>, Микшина П.В.<sup>1</sup>, Петрова О.Е.<sup>1,2</sup>, Кадыйров А.И.<sup>3</sup>, Воробьев В.Н.<sup>1</sup>, Горшкова Т.А.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>.*

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup>Лаборатория инфекционных заболеваний ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>3</sup>Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

E-mail: bah-islam80@mail.ru

Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) в сосудах инфицированных растений табака (неспецифичный хозяин) образуют особые «многоклеточные» структуры – бактериальные эмболы. «Затравками» для формирования этих структур, а также их первичными матриксом, служат высокомолекулярные фрагменты пектинового полисахарида растений – рамногалактуронана I (РГ-I). По мере развития бактериального эмбола матрикс из РГ-I замещается экзополисахаридами (ЭПС) *Pba*. Важными пробелами в описании биогенеза бактериальных эмболов является то, что возможность образования первичного матрикса из РГ-I в инфицированных *Pba* растениях картофеля (специфичный хозяин) не продемонстрирована, а свойства ЭПС *Pba* не охарактеризованы.

Полисахариды растений и бактерий выделяли и/или анализировали с помощью гель-проникающей и ионообменной хроматографии. Свойства ЭПС определяли с помощью вискозиметрии, динамического светорассеяния, а также специальных тест-систем для анализа антиоксидантных и фитоиммунных свойств.

Показано, что в инфицированных *Pba* растениях картофеля образуются «затравки» для «сборки» бактериальных эмболов – высокомолекулярные (100-400 кДа), низкозамещенные фрагменты РГ-I, не имеющие прочной связи с растительной клеточной стенкой; в сосудах первичной ксилемы при этом формируются бактериальные эмболы. ЭПС *Pba* увеличивают вязкость водных растворов, а также формируют крупные агрегаты с гидродинамическим радиусом до 8 мкм. Эти свойства ЭПС могут обеспечить поддержание структурной целостности бактериального эмбола после разрушения РГ-I. Кроме того, ЭПС *Pba* обладают выраженными антиоксидантными и фитоиммуносупрессорными свойствами. Эти свойства могут нейтрализовать действие активных форм кислорода, образование которых индуцируется при развитии бактериальных эмболов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90124 (анализ полисахаридов растений) и мегагрантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1881 (анализ ЭПС).

## Сульфатированные углеводсодержащие биополимеры морской грамотрицательной бактерии *Kangiella japonica*

*Кокоулин М.С.<sup>1</sup>, Кузьмич А.С.<sup>1</sup>, Романенко Л.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

E-mail: [maxchem@mail.ru](mailto:maxchem@mail.ru)

Грамотрицательные бактерии являются неотъемлемым компонентом морской экосистемы и представляют значительную часть микробных сообществ океана. Углеводсодержащие биополимеры, связанные с клеточной стенкой грамотрицательных бактерий, участвуют во взаимодействиях между клеткой и окружающей средой и играют важную роль в адаптации микроорганизмов к специфическим условиям обитания (соленость, температура и наличие питательных веществ).

Штамм *Kangiella japonica* КММ 3897 был изолирован из образца воды, собранной в прибрежной зоне Японского моря. Капсульный полисахарид (КПС) был смыт с поверхности бактериальных клеток солевым раствором, липополисахарид (ЛПС) - экстракцией горячим водным фенолом. На основании данных химического анализа, спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии, были установлены структуры КПС и ЛПС. Показано, что КПС и О-специфический полисахарид в составе ЛПС имеют идентичную структуру и построены из линейных трисахаридных повторяющихся звеньев, состоящий из двух остатков D-глюкозамина, один из которых сульфатирован по 4 и 6 положениям, и 2-амино-2-дезоксид-маннуроной кислоты. Относительно короткий олигосахарид кора в составе ЛПС построен из остатков 2-амино-2-дезоксид-глюкозы, L-глицеро-D-манно-гептозы и 3-дезоксид-манно-октулозоновой кислоты. Исследование липида А методом масс-спектрометрии показало, что он представляет собой смесь пента- и тетрацильных изоформ. Дифосфорилированная диаминогенциобиоза с наивысшей степенью ацилирования несет 11:0(3-ОН), 11:0(3-О-11:0) и 11:0(3-ОН)[3-О-11:0] жирные кислоты в положения 2, 2' и 3, соответственно.

Хорошо известно, что сульфатированные полисахариды обладают выраженным противоопухолевым действием, проявляя антипролиферативные, антиметастатические, проапоптотические и антиангиогенные свойства. Показано, что сульфатированный КПС *K. japonica* КММ 3897 проявляет избирательный антипролиферативный эффект по отношению к клеткам протоковой карциномы молочной железы линии T-47D за счет ареста клеточного цикла в фазе G0/G1, подавления процессов образования активных комплексов CDK4/CDK6/D1 и торможения фосфорилирования белка ретинобластомы (Rb).

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

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ и МНТ в рамках научного проекта № 21-54-52005

## Гомополисахариды как молекулы адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям существования

Коннова С.А.<sup>1,2</sup>, Ибрахим И.М.<sup>3</sup>, Сигида Е.Н.<sup>1</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, РФ

<sup>2</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, РФ

Эль-Фаюмский Университет, сельскохозяйственный факультет, г. Фаюм, Египет

E-mail: correspond author [Konnovasa@yandex.ru](mailto:Konnovasa@yandex.ru)

Необходимость выживания микроорганизмов в условиях высокой засоленности среды диктует развитие различных адаптационных стратегий, которые реализуются галофильными и галотолерантными микроорганизмами. Так наряду с известными способами осмоадаптации: «соль внутри» и продукцией осмолитов, многие микроорганизмы синтезируют на поверхности гликополимеры – экзополисахариды (ЭПС). Из 80 штаммов галотолерантных микроорганизмов, изолированных нами из солёных озёр Карун (Египет) и Эльтон (Россия), 47 % являются продуцентами ЭПС, т.е. для них, синтез гликополимеров – дополнительная стратегия выживания в экстремальных средах. В составе изолятов галофильных микроорганизмов идентифицированы представители семейств Halobacteriaceae, Halomonadaceae и Bacillaceae. Среди продуцентов ЭПС с достаточно высоким выходом полимеров (5 - 13 г/л) и содержанием в них углеводов (до 98%) многие культуры синтезировали гетерогенные по молекулярной массе смеси ЭПС. Из 9 культур - продуцентов ЭПС выделен 21 препарат полисахарида, из которых 7 были маннанами и 4 - фруктанами. С использованием спектроскопии ЯМР установлено, что ЭПС *Chromohalobacter salexigens* EG1QL3 и *Bacillus licheniformis* EG1QL30 представлены фруктанами (леванами) с повторяющимся звеном следующей структуры:  $\rightarrow 6) - \beta - D - \text{Fruf}(2 \rightarrow$ . Способность синтезировать гомополисахариды широко распространена у различных микроорганизмов, в частности, представители архей Halobacteria, приспособленные к крайне высоким концентрациям соли, характеризуются высокой активностью ферментов биосинтеза полифруктанов, что указывает на сильную, но неисследованную связь между биосинтезом фруктанов и адаптированностью к осмотическому шоку. При этом большинство микробных ЭПС нетоксичны, биоразлагаемы, безопасны для окружающей среды и сохраняют активность при экстремальных температурах, pH и солёности [1]. В докладе будут представлены данные по продукции гомополисахаридов как одного из универсальных адаптационных ответов на изменяющиеся условия среды.

### Список литературы:

1. Costa OYA, Raaijmakers JM, Kuramae EE Review Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01636.

## **Роль фукозилированных гликанов в акцептивном иммунитете человека**

*Кононова С.В.<sup>1,2</sup>, Литвинова Е.А.<sup>3</sup>, Скалинская М.И.<sup>1,5</sup>, Ситкин С.И.<sup>1,5</sup>, Вахитов Т.Я.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», С.-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Институт белка РАН, Пушкино, Московская обл., Россия*

<sup>3</sup>*Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

<sup>4</sup>*Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН, р.п. Краснообск, Новосибирская область, Россия*

<sup>5</sup>*ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: [skonon23@gmail.com](mailto:skonon23@gmail.com)*

Изучение причин роста числа различных неинфекционных хронических воспалительных заболеваний привлекло внимание к механизмам взаимодействия иммунной системы человека с его микробиотой. Взаимодействие иммунной системы человека с кишечной микробиотой (так называемый акцептивный иммунитет) сочетает в себе механизмы врожденного и адаптивного иммунитета и способствует развитию мутуализма «хозяин–микробиом». Стенки бактериальных клеток и адгезины могут иметь углеводные паттерны для распознавания со стороны иммунной системы, которые аналогичны углеводным паттернам хозяина. В эти структуры бактерии могут включать моносахариды, полученные из гликанов хозяина. Так, при установлении симбиоза фукозилированные бактериальные гликаны могут синтезироваться из фукозилированных олигосахаридов молока, муцинов и гликанов, секретируемых иммуноглобулинов. При этом происходит отбор бактерий, имеющих ферментативные системы для утилизации таких гликанов. Это является частью контроля микробиоты со стороны хозяина. И хозяин, и кишечная микробиота регулируют фукозилирование гликанов хозяина. Нарушение этого процесса связано с развитием хронических воспалительных заболеваний, например, воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 20-65-47026).

## Структурные особенности сульфатированных полисахаридов дальневосточных красных водорослей семейств Gigartinaceae, Phyllophoraceae и Tichocarpaceae

*Кравченко А.О., Анастюк С.Д., Глазунов В.П., Исаков В.В., Ермак И.М.*

*Тихоокеанский институт биорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия*

*E-mail: kravchenko\_25.89@mail.ru*

Сульфатированные галактаны – каррагинан и агар – относятся к числу структурных полисахаридов (ПС) водорослей отдела Rhodophyta. Эти ПС являются нетоксичными соединениями с уникальными физико-химическими свойствами и разнообразной биологической активностью, поэтому в последние годы находят широкое применение в биомедицине. В свою очередь, свойства этих ПС находятся в тесной взаимосвязи с их структурой, которая определяется видовой принадлежностью водорослей, стадией жизненного цикла и условиями их обитания, что обуславливает важность детального установления тонкой структуры индивидуальных ПС и изучение ее взаимосвязи с экзогенными и эндогенными факторами.

На Дальнем Востоке широко произрастают как каррагинанофиты, так и агарофиты различных семейств. Совместное использование широкого арсенала химических и физико-химических методов анализа, а также кислотного и ферментативного гидролиза позволило установить, что основной особенностью ПС семейств Gigartinaceae, Phyllophoraceae и Tichocarpaceae является их гибридная структура, в основе которой лежит повторяющееся каррабиозное звено. Было показано, что гаметофиты *Ahnfeltiopsis flabelliformis* и *Mastocarpus pacificus* продуцируют в основном  $\kappa/\beta$ - и  $\kappa/\iota$ -каррагинаны [1], соответственно, тогда как ПС из цистокарпов *A. flabelliformis* представляет собой  $\iota/\kappa$ -каррагинан и содержит в минорных количествах агароподобный ПС. Установлено, что желелирующий ПС из *Tichocarpus crinitus* имеет гибридную  $\kappa/\beta$ -структуру [2], тогда как в основе нежелелирующего ПС лежит дисахаридное звено, состоящее из 1,3-связанной  $\beta$ -D-галактозы 2,4-дисульфат и 1,4-связанной 3,6-ангидрогалактозы. Структуры желелирующих ПС семейства Gigartinaceae независимо от фазы жизненного цикла водоросли представлены в основном  $\kappa$ - в случае *Chondrus armatus* и  $\iota/\kappa$ -каррагинанами в случае *C. pinnulatus*. Нежелелирующие ПС этого семейства имеют структуру  $\lambda$ -каррагинана. Установлена взаимосвязь между накоплением ПС в водорослях и условиями их обитания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-20019.

### *Список литературы:*

1. Kravchenko A.O., Anastjuk S.D., Glazunov V.P., Sokolova E.V., Isakov V.V., Yermak I.M. Structural characteristics of carrageenans of red alga *Mastocarpus pacificus* from sea of Japan. *Carbohydrate Polymers* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115518>
2. Byankina (Barabanova) A.O., Sokolova E.V., Anastjuk S.D., Isakov V.V., Glazunov V.P., Volod'ko A.V., Yakovleva I.M., Solov'eva T.F., Yermak I.M. Polysaccharide structure of tetrasporic red seaweed *Tichocarpus crinitus*. *Carbohydrate Polymers* (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.063>

## Антибактериальные свойства фукоиданов из бурых водорослей *Fucus vesiculosus* Баренцева моря

Лапина И.М.<sup>1,2</sup>, Айрапетян О.Н.<sup>1,2,3</sup>, Облучинская Е.Д.<sup>4</sup>, Журишкина Е.В.<sup>1,2</sup>, Скорик Ю.А.<sup>5</sup>, Лебедев Д.В.<sup>1,2,6</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия

<sup>5</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup>Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, Москва, Россия

E-mail: [lapina\\_im@npfi.nrcki.ru](mailto:lapina_im@npfi.nrcki.ru)

Необходимость поиска новых антимикробных средств обусловлена ростом резистентности патогенных штаммов к антибиотикам. Фукоиданы, сульфатированные полисахариды из клеточных стенок бурых водорослей, обладающие широким спектром биологической активности, рассматриваются как многообещающие противомикробные препараты, которые в некоторой степени могут заменить использование сильных химических антисептиков и антибиотиков. Природные фукоиданы - полидисперсные полисахариды, состав которых может сильно различаться в зависимости от вида, среды обитания водорослей, а также способов выделения и очистки полисахаридов.

Целью работы являлось исследование антибактериальных свойств двух фракций сульфатированных полисахаридов разной степени очистки из бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, собранных на литорали Баренцева моря [1].

Грубая фракция фукоиданов была выделена из водорослей при помощи экстракции водным этанолом и ультразвуковой обработки. Очищенную фракцию получили дополнительной обработкой грубой фракции раствором хлористого кальция.

Фукоиданы были охарактеризованы как высоко гетерогенные по молекулярной массе ацетилированные  $\alpha$ -L-фуканы, содержащие сходные количества полифенолов, но состав очищенной фракции отличался соотношением моносахаридов и сниженным содержанием сульфатов и уроновых кислот.

Антибактериальные свойства обоих образцов полисахаридов были оценены в отношении *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* с использованием спектрофотометрии и окрашиванием акридиновым оранжевым. Также для анализа состояния бактерий были применены тест с резазурином и атомно-силовая микроскопия.

Фукоиданы оказывали бактериостатический эффект на рост всех исследуемых микроорганизмов, минимальная ингибирующая концентрация варьировалась в пределах от 4 до 6 мг/мл, при этом *E. coli* проявляли наибольшую чувствительность к обеим фракциям полисахаридов, тогда как в целом грубая фракция фукоиданов обнаруживала большую ингибирующую активность в отношении микробов по сравнению с очищенной.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663.

Список литературы:

1. Ayrapetyan, O.N.; Obluchinskaya, E.D.; Zhurishkina, E.V.; Skorik, Y.A.; Lebedev, D.V.; Kulminskaya, A.A.; Lapina, I.M. Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology* **2021**, *10*, 67. <https://doi.org/10.3390/biology10010067>

## **Зависимость физико-химических свойств полисахаридов от условий инкубирования сырых плодов яблони в искусственной гастральной среде**

*Патова О.А.*

*ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия*

*E-mail: patova\_olga@mail.ru*

Современные диетические рекомендации указывают на необходимость достаточного ежедневного потребления растительной пищи, богатой растительными полисахаридами. В зависимости от структуры полисахариды могут сильно различаться по физико-химическим свойствам и механизм их воздействия на физиологические процессы, протекающие в организме человека, могут различаться. Ранее считалось, что, они устойчивы к перевариванию секретами желудочно-кишечного тракта ЖКТ. В настоящее время показано, что на полисахариды клеточной стенки воздействует среда верхних отделов ЖКТ, что влияет на процесс переваривания растительной пищи. Механизмы переваривания растительной пищи в верхних отделах ЖКТ плохо изучены.

В работе исследовано влияние условий обработки плодов яблони *Malus domestica* L. в искусственной гастральной среде на свойства растворимых (РК) и нерастворимых (НК) компонентов клеточных стенок. Яблоки гомогенизировали, последовательно обрабатывали слюной (3 мин, 37°C) и искусственной гастральной жидкостью (SGF) в течение 2 ч при 37°C. Варьировали рН инкубирования (5.0, 3.0, 1.8) и соотношение растительного материала к SGF (1:0.05, 1:0.5, 1:1, v/v). Пектин (GalA 77 %, Mw 1800 кДа, выход 2.0%) был главным высокомолекулярным компонентом РК, полученного при рН 1.8; тогда как при рН 3.0 и 5.0 вместе с пектином растворялись белковые (30–50 %) и фенольные (2–3 %) соединения (общий выход 0.4%). Кроме того, пектин, выделенный при рН 3.0 и 5.0, отличался небольшой молекулярной массой (Mw 17 кДа), низким содержанием GalA (29–37 %). RG-I и HG обнаружены во всех пектинах. HG был главным компонентом пектина, экстрагированного при рН 1.8; RG-I был главным компонентом пектинов, экстрагированных при рН 3.0 и 5.0. Показано, что растворение пектинов клеточной стенки плодов яблони в SGF способствует увеличению вязкости РК, снижению жесткости растительного материала, увеличению водоудерживающей способности НК и способности высокомолекулярных компонентов к замедлению диффузии глюкозы.

## **Полисахаридный ансамбль растительных клеточных стенок и их механические свойства**

*Петрова А.А., Козлова Л.В., Горшкова Т.А.*

*Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр  
«Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия  
E-mail: kozlova@kibb.knc.ru*

Растительные клетки окружены оболочкой, называемой клеточной стенкой. Она представляет собой сложное надмолекулярное образование на основе углеводов в сочетании с белками и фенольными соединениями. Состав и архитектура клеточных стенок строго детерминированы в различных таксонах растительного царства, в разных тканях и на разных этапах развития клеток. В молодых растениях тонкие первичные клеточные стенки при поддержке тургора функционируют как гидростатический скелет. Они способны растягиваться и локальные изменения их упругости определяют будущую форму как самих клеток, так и всего организма в целом. В более зрелых растениях развитые клеточные стенки механических тканей, называемые вторичными и третичными, уже не нуждаются в наличии внутреннего давления для придания прочности различным органам. Соотнесение состава клеточных стенок с их механическими свойствами представляет собой актуальную задачу современной гликобиологии. Прогресс в ее решении может быть достигнут при сопоставлении данных, полученных с использованием различных методов микроскопии.

Исследовав динамику механических свойств и состава первичных клеточных стенок в корне кукурузы, мы показали, что каждый из этапов развития клеток сопровождается не только реорганизацией их клеточных стенок, но и достоверными изменениями их упругости. Вторичные и третичные клеточные стенки, исследовавшиеся в волокнах флоэмы и ксилемы льна, обладают предсказуемыми механическими свойствами, даже если формирование таких клеточных стенок было вызвано искусственно.

Работа ведется при поддержке Российского научного фонда (18-14-00168).

**Физиологическая активность пектиновых полисахаридов кипрея  
узколистного *Epilobium angustifolium***

Попов С.В.

Институт физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: [s.v.popov@inbox.ru](mailto:s.v.popov@inbox.ru)

Два пектиновых полисахарида Eap-4 и Eap-0,8 с содержанием галактурановой кислоты 78 и 66% выделены из кипрея узколистного *E. angustifolium* экстракцией водным раствором соляной кислоты при pH 4 и 0,8.

Обнаружено, что полисахариды кипрея в концентрациях 0,03-0,3 мг/мл ингибируют DPPH радикал на 10-90%. Полуингибирующая концентрация Eap-4 и Eap-0,8 составляет 0,10 и 0,22 мг/мл, соответственно. Установлено, что фракции, полученные разделением полисахаридов с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, преимущественно не обладают антиоксидантной активностью. С помощью ферментативного гидролиза с последующим осаждением этанолом получено 6 фракций Eap-4 и три фракции Eap-0,8, отличающихся содержанием разветвленных и неразветвленных фрагментов макромолекул. Показано, что антиоксидантная активность полученных фракций сравнима или превышает активность исходных полисахаридов. С помощью корреляционного анализа установлено, что способность ингибировать DPPH радикал прямо зависит от содержания в полисахаридах фенольных примесей, остатков ксилозы и глюкозы, и отрицательно коррелирует с содержанием остатков галактурановой кислоты. С помощью множественной пошаговой регрессии обнаружено, что вклад содержания фенольных примесей и остатков ксилозы в предсказание антиоксидантной активности полисахаридов кипрея составляет 52 и 8%, соответственно.

Обнаружено, что Eap-4 и Eap-0,8 в концентрациях 0.015-0.5 мг/мл стимулируют продукцию фактора некроза опухолей лейкоцитами цельной крови человека *in vitro*. В концентрации 0.5 мг/мл степень активации клеток полисахаридами Eap-4 и Eap-0,8 составляет 604 и 456 %, что сравнимо со стимулирующей активностью липополисахарида – 580%, в концентрации 0.002 мкг/мл, использованного в качестве положительного контроля.

Таким образом, из кипрея узколистного *E. angustifolium* выделены пектиновые полисахариды, которые обладают антиоксидантной и иммуностимулирующей активностью.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-73-20005).

## Встраивание гликолипидов в клетку и их релиз из клетки в виде микровезикул

*Рапопорт Е.М., Бовин Н.В.*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)*

*E-mail: eugenia\_rapoport@mail.ru*

Плазматическая мембрана на 20% состоит из гликофинголипидов (ГСЛ), которые вовлечены в межклеточную адгезию и передачу клеточных сигналов благодаря формированию микродоменов с Src-киназами и белками-медиаторами межклеточной адгезии. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что ГСЛ способны не только связываться с сигнальными белками, но и переходить с клетки на клетку (или на бактерии), оказываясь там, где отсутствует машинерия для их синтеза. Механизм трафика ГСЛ почти не изучен, в особенности мало информации, как они преодолевают гликокаликс клетки-донора и переносятся через гликокаликс клетки-акцептора, участвуют ли в переносе ГСЛ белки плазмы крови, какие белки клетки-акцептора, связываясь с гликаном в составе ГСЛ, способствуют их встраиванию в клетку. Трудности в исследовании ГСЛ связаны с отсутствием необходимого молекулярного инструментария, так как природные ГСЛ гетерогенны, на реагентном рынке мало доступны, а их выделение затруднено вследствие их низкого содержания, разнообразия по углеводной части и гетерогенности по липидной. В лаборатории Углеводов ИБХ синтезированы аналоги природных ГСЛ, получившие родовое название FSL (functional spacer lipid); благодаря наличию остатка DOPE (1,2-*O*-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина), они сохраняют способность природных прототипов встраиваться в мембрану клетки. В данном докладе обсуждается: 1) как происходит встраивание и релиз FSL из клетки, микровезикулярный механизм этих процессов; 2) где они локализованы в клетке, 3) как влияет природа гликана на процессы встраивания и выхода FSL из клетки, 4) участвует ли альбумин в переносе FSL. Полученная информация важна не только для понимания механизма переноса гликофинголипидов от клетки к клетке, но также для изучения общего везикулярного процесса передачи вещества и информации при коммуникации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №20-04-00677.

## Структура и биологическая активность липополисахаридов почвенных бактерий *Azospirillum* spp.

Сигида Е.Н.<sup>1</sup>, Здоровенко Э.Л.<sup>2</sup>, Дмитренко А.С.<sup>2</sup>, Бурыгин Г.Л.<sup>1</sup>, Евсеева Н.В.<sup>1</sup>,  
Ткаченко О.В.<sup>3</sup>, Лобачев Ю.В.<sup>3</sup>, Коннова С.А.<sup>1,4</sup>, Федоненко Ю.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

<sup>4</sup> Саратовский научно-исследовательский государственный университет

им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

E-mail: [si\\_elena@mail.ru](mailto:si_elena@mail.ru)

Свободноживущие ассоциативные бактерии рода *Azospirillum* широко распространены в различных климатических зонах и увеличивают рост и урожайность различных растений, в том числе важнейших злаковых культур. Целью работы являлось изучение строения липополисахарида (ЛПС) типового штамма *Azospirillum canadense* DS2(T), его влияния на морфометрические показатели проростков пшеницы и исследование влияния структурно различных ЛПС на морфогенез и выход растений-регенерантов в каллусах пшеницы.

ЛПС выделяли из высушенной биомассы по методу Вестфаля. ОПС получали мягким кислотным гидролизом ЛПС и последующей гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50. Моносахаридный анализ О-полисахарида (ОПС) проводили методом газо-жидкостной хроматографии ацетатов полиолов. Для определения морфогенной активности пшеничных каллусов растений использовали сестринские линии LRht-B1c и LRht-B1a мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L. cv. Saratovskaya 29).

На основании данных моносахаридного анализа, <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии ЯМР включая <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY, и <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC и HMBC экспериментов, была установлена структура ОПС *A. canadense* DS2(T). В составе ОПС выявлено присутствие двух типов повторяющихся звеньев: →2)-α-L-Rhap-(1→3)-[β-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→(1) и →4)-α-L-Rhap-(1→3)-[β-D-GalpNAc4Me-(1→4)]-β-D-ManpNAc-(1→(2). Полисахарид (1) ранее обнаружен в составе ОПС *A. brasilense* S17, а полисахарид (2) – в составе ОПС *A. brasilense* SR8. При добавлении ЛПС *A. canadense* DS2(T) в среду Фареуса в концентрации 10 мкг/мл наблюдалось увеличение длины побега и корней у 7-суточных проростков пшеницы, по сравнению с контролем.

Добавление ЛПС *A. lipoferum* SR65 в среду культивирования каллусов значительно способствовало морфогенезу каллусов, увеличивая выход растений-регенерантов в 2,15 и в 3,75 раз, соответственно, у высокоморфогенной линии LRht-B1c и слабоморфогенной LRht-B1a линий пшеницы. ЛПС *A. brasilense* SR55 и SR75 увеличивали либо только выход морфогенных каллусов, либо только регенерированных растений у обеих линий.

## Влияние маннано́в на гравитропизм побегов растения и его возможные механизмы

Пожванов Г.А.<sup>1,2,3</sup>, Липчинский А.А.<sup>1</sup>, Суслов Д.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [d.suslov@spbu.ru](mailto:d.suslov@spbu.ru)

Маннаны являются минорными гемицеллюлозами в клеточных стенках покрытосеменных растений и, наряду с ксиланами, считаются самыми древними представителями данного класса полисахаридов [1]. Выход на сушу и последующая эволюция наземных растений сопровождалась появлением и накоплением в клеточных стенках гемицеллюлоз ксилоглюканов с постепенным снижением уровня маннано́в. Мы обнаружили, что тройной маннан-дефицитный мутант арабидопсиса *csla2csla3csla9* демонстрирует большую скорость изгиба побега в ходе гравитропизма – ростового ответа, обеспечивающего вертикальный рост побегов. Появление гравитропизма побегов связывают с выходом растений на сушу [2]. Поэтому выяснение механизмов влияния маннано́в на гравитропизм поможет лучше понять организацию и пути эволюции клеточных стенок растений при адаптации к наземному образу жизни.

Целью работы было выяснение механизмов ускорения гравитропического изгиба побегов мутантных растений арабидопсиса *csla2csla3csla9* на уровне биомеханики клеточных стенок и метаболизма. Проростки выращивали на вертикальных чашках Петри и индуцировали изгиб их побегов (гравистимуляция) путем поворота чашек на 90 градусов против часовой стрелки. Исследование биомеханики клеточных стенок проводили методом крипа, а низкомолекулярные метаболиты анализировали ГХ-МС.

Анализ биомеханики показал, что влияние на гравитропизм у мутанта связано с изменением характера взаимодействий между полимерами клеточной стенки. Метаболомный анализ выявил уменьшение у мутанта в ходе гравистимуляции уровня аминокислоты гидроксипролина – маркера структурных гликопротеинов клеточной стенки. Предполагаемое влияние недостаточности маннано́в на гравитропизм через изменение уровня структурных белков клеточной стенки может быть связано с тем, что ГДФ-манноза служит общим биосинтетическим предшественником маннано́в и аскорбата [3], а аскорбат является кофактором в гидроксировании пролина белков с образованием гидроксипролина [4].

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00424.

### Список литературы:

1. Popper Z.A. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* (2008), doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012
2. Hejnowicz Z. Gravitropism in herb and trees: a major role for the redistribution of tissue and growth stresses. *Planta* (1997), doi: 10.1007/pl00008102
3. Sawake S., Tajima N., Mortimer J.C. et al. KONJAC1 and 2 are key factors for GDP-mannose generation and affect L-ascorbic acid and glucomannan biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (2015), doi: 10.1105/tpc.15.00379
4. Smirnoff N., Wheeler G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (2000), doi: 10.1080/10409230008984166

## Структурные особенности фукоиданов некоторых видов бурых водорослей порядка Laminariales

*Усольцева Р.В., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Зуева А.О., Анастюк С.Д.,  
Звягинцев Н.В., Расин А.Б., Ермакова С.П.*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия  
E-mail: Usoltseva-R@yandex.ru*

Фукоиданы – биологически активные сульфатированные полисахариды бурых водорослей, характеризующиеся большим структурным разнообразием и уникальными свойствами, находящимися в тесной взаимосвязи с их структурой. Бурые водоросли порядка Laminariales широко распространены в морях Дальнего Востока России и представляют собой богатый и легко возобновляемый источник полисахаридов, в том числе фукоиданов.

Целью настоящей работы являлось получение индивидуальных препаратов фукоиданов из четырех видов бурых водорослей: *Alaria angusta*, *Laminaria longipes*, *Saccharina dentigera* и *Tauya basicrassa*, и изучение их строения с помощью ферментативных, химических, а также физико-химических методов.

Были определены структурные характеристики выделенных полисахаридов: моносахаридный состав, содержание сульфатных и ацетильных групп, молекулярно-массовое распределение. Тонкая структура нативных и модифицированных поли- и олигосахаридов была изучена методом спектроскопии ЯМР. Структуры низкомолекулярных производных фукоиданов, полученных методом автогидролиза, а также кислотного гидролиза при нагревании, были исследованы с помощью масс-спектрометрии [1-3].

Было показано, что *S. dentigera* и *L. longipes* синтезируют сульфатированные фуканы, *T. basicrassa* – сульфатированный и ацетилированный фукогалактан, а *Alaria angusta* – полисахариды различного строения. Основная цепь фукана из *S. dentigera* была построена из 1,3-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы; фукана из *L. longipes* – из 1,3-, 1,4 и 1,2-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы; фукогалактана из *T. basicrassa* – из 1,6-связанных остатков  $\beta$ -D-галактозы. Полисахариды из *A. angusta* были идентифицированы как сульфатированный и ацетилированный галактофукан с основной цепью из 1,3-связанных остатков  $\alpha$ -L-фукозы, а также 1,3;1,4- $\alpha$ -L-фукан.

Таким образом, исследованные бурые водоросли порядка Laminariales представляют собой перспективные источники фукоиданов различного строения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ВАНТ в рамках научного проекта № 21-53-54003 и Стипендии Президента РФ СП-1226.2021.4

### *Список литературы:*

1. Zvyagintseva T.N., Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Anastyuk S.D., Isakov V.V., Zvyagintsev N.V., Krupnova T.N., Zadorozhny P.A., Ermakova S.P. Composition of polysaccharides and radiosensitizing activity of native and sulfated laminarans from the *Tauya basicrassa* Kloczc. et Krupn. Carbohydrate Polymers (2020). DOI:10.1016/j.carbpol.2020.116921.
2. Usoltseva R.V., Shevchenko N.M., Malyarenko O.S., Anastyuk S.D., Kaspruk A.E., Zvyagintsev N.V., Ermakova S.P. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity *in vitro*. Carbohydrate Polymers (2019). DOI:10.1016/j.carbpol.2019.05.079.

3. Menshova R.V., Anastyuk S.D., Ermakova S.P., Shevchenko N.M, Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Structure and anticancer activity *in vitro* of sulfated galactofucan from brown alga *Alaria angusta*. Carbohydrate Polymers (2015). DOI:10.1016/j.carbpol.2015.06.020.

## СЕКЦИЯ «Современные методы исследования в гликобиологии»

### Селективное дезацетилирование арилгликозидов

*Абрамов А. А., Степанова Е. В.*

*ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, Россия*

*E-mail: Abramov@tpu.ru*

Частично ацетилированные арилгликозиды широко распространены во многих растениях в качестве вторичных метаболитов и выполняют защитную функцию в растениях, обуславливая их взаимодействие с насекомыми и травоядными животными. Кроме того, было показано, что частично ацетилированные арилгликозиды обладают различной биологической активностью (противовоспалительной, противораковой) [1,2], что делает их перспективными соединениями для использования в медицине и фармацевтике. Многие моноацетилированные арилгликозиды были выделены из растений, но их синтез является сложной задачей, в основном реализующейся посредством синтеза с использованием различных защитных групп [3]. Недостаток данного метода заключается в большом количестве стадий, что приводит к уменьшению суммарного выхода.

Ранее на нескольких примерах был показан одностадийный региоселективный синтез 2-О-ацетил арилглюкопиранозидов с помощью кислотно-катализируемого дезацетилирования *пер*-ацетилированных гликозидов [4]. В данной работе мы применяем метод селективного дезацетилирования к различным арилгликозидам.

В качестве исходных сахаров были взяты D-глюкоза, L-рамноза и D-манноза. Соответствующие арилгликозиды дезацетилировали в системе хлористый метилен/этанол под действием соляной кислоты при 30 °С. Таким образом, были получены моноацетилированные арилгликозиды. Побочными продуктами в данных реакциях являются три- и диацетилированные производные и дезацетилированные соединения. В дальнейшем они ацетилировались с помощью системы уксусный ангидрид/пиридин с получением исходных *пер*-ацетатов, которые могут быть использованы в повторной реакции дезацетилирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-73-10211

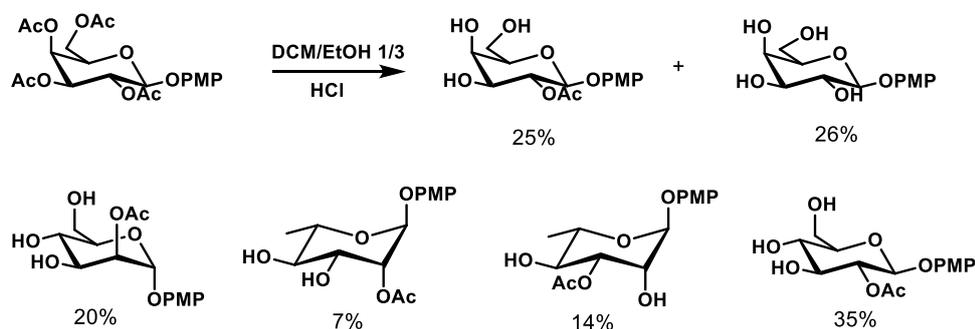


Схема 1. Селективное дезацетилирование арилгликозидов и примеры полученных моноацетатов

#### Список литературы:

1. *Dagvadorgj, E., et al.* Phenolic glucosides from *Hasseltia floribunda*, *Phytochem.*, 2010, 10.1016/j.phytochem.2010.08.004
2. *Kim, C. S., et al.* Salicin derivatives from *Salix glandulosa* and their biological activities, *Fitoterapia*, 2015, 10.1016/j.fitote.2015.08.013

3. *Lehtila, R. L. et al.* Selectively protected galactose derivatives for the synthesis of branched oligosaccharides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 10.1016/j.tet.2004.02.054

4. *Stepanova, E. V., et al.* A new look at acid catalyzed deacetylation of carbohydrates: A regioselective synthesis and reactivity of 2-acetyl aryl glycopyranosides, *Carbohydr. Res.*, 2018, 10.1016/j.carres.2018.02.003

## Силильные группы как инструмент контроля размера цикла и стереоселективности гликозилирования, включая арабинофуранозилирование

Абронина П. И.

<sup>1</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Российская Федерация

E-mail: Polina-Abronina@yandex.ru

Разработка принципиально новых подходов к эффективному и стереоселективному синтезу фуранозидов является крайне актуальным направлением исследований ввиду их огромной биологической значимости.

В докладе будут рассмотрены новые методы синтеза фуранозидов, основанные на изменении размера цикла моносахаридов, содержащих силильные заместители [1, 2].

Особое внимание будет уделено применению силильных групп (в комбинации с ортогональными к ним ацильными группами) в стереоселективном синтезе биологически значимых олигосахаридов, включая олигоарабинофуранозиды клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* без использования бензильных групп, удаление которых в традиционных восстановительных условиях несовместимо с наличием чувствительных к гидрогенолизу фрагментов [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20164).

### Список литературы:

1. P. Abronina et al. A ring contraction of 2,3-di-O-silylated thiopyranosides to give thiofuranosides under mildly acidic conditions, *Org. Lett.* (2018). DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02424.
2. P. Abronina et al. The Influence of Anomeric Configuration and Aglycone Structure on the Outcome of Acid-Promoted Ring Contraction in 2,3-Di-O-Silylated S-Galactopyranosides, *Chem. Select* (2021). DOI: 10.1002/slct.202101441.
3. P. Abronina et al. The use of O-trifluoroacetyl protection and profound influence of the nature of glycosyl acceptor in benzyl-free arabinofuranosylation *Carbohydr. Res.* (2014). DOI: 10.1016/j.carres.2014.05.017.

# Синтетические методы получения природных ацилированных арилгликозидов

Аветян Д.Л.

ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, Россия

e-mail: avetyanll@gmail.com

При биологическом изучении растений одна из задач — правильное определение таксономической принадлежности объекта. В качестве маркеров для такого исследования применяются вторичные метаболиты растений [1], к которым относятся и арилгликозиды — углеводы с фенольным агликоном в составе, этерифицированные различными остатками кислот [2]. Такая процедура — хемотаксономический анализ — требует достаточное количество соединений-маркеров. Индивидуальное получение арилгликозидов из самих природных источников нерационально из-за довольно низкого содержания целевых продуктов, затратного процесса выделения, редкости самих растений и других особенностей [3]. Химический синтез позволяет применять распространённые и легкодоступные субстраты вроде глюкозы, ванилина, других простых углеводов и фенолов.

В этой работе мы предложили химический синтез арилгликозидов ацилированных по углеводному остатку или агликону **7-8a-c**, исходя из ацетобромоглюкозы (**1**), получаемой из глюкозы **2**, ванилина и фенола (**Рисунок 1**).

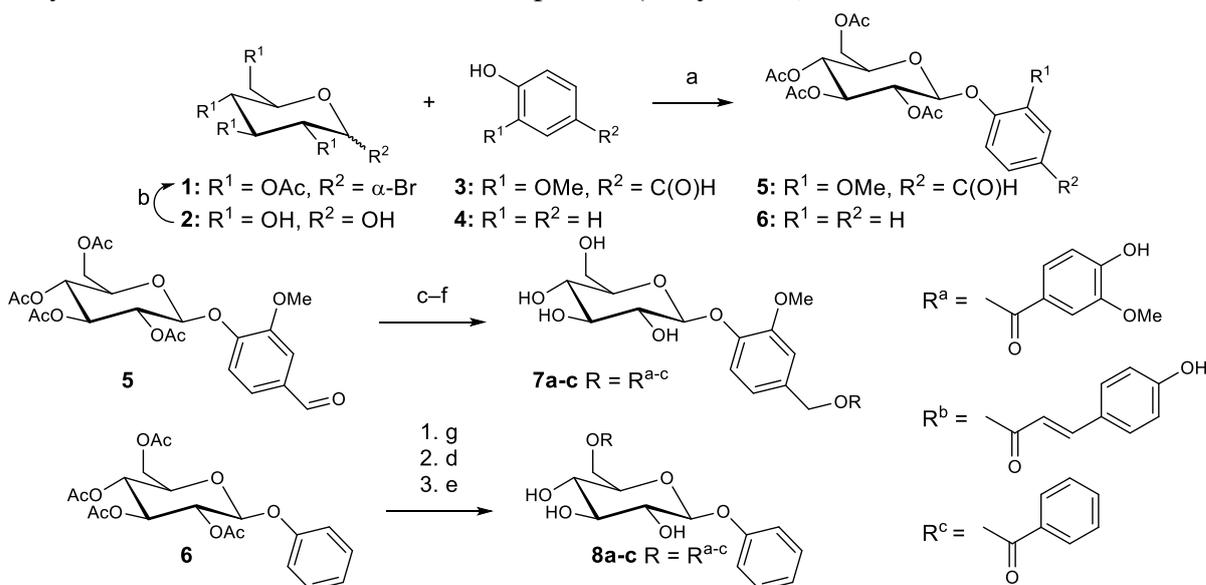


Рисунок 1. Общая схема синтеза ацилированных арилгликозидов: **a** —  $Ag_2O$ , хинолин; **b** — 1.  $Ac_2O, HClO_4$ , 2.  $PBr_3$ , 3.  $H_2O$ ; **c** —  $NaBH_4$ , CTMAV,  $H_2O/CHCl_3$ ; **d** —  $MeONa, MeOH$ , **e** — 1.  $CBr_4, PPh_3, solvent$ ; 2.  $R^{a-c}OH, K_2CO_3, DMF$ ; **f** [4] —  $HCl/EtOH/CHCl_3$  (1:3:1 vol.), **g** —  $MeONa, MeOH$ .

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90041.

## Список литературы:

- Lindroth, R.L., et al., *Oecologia*. **1987**, 74, 144–148, doi: 10.1007/BF00377359.
- Степанова, Е.В. *Дисс. ... канд. хим. н.: 02.00.03, Томск, 2014*, 144 с.
- Zuo, A.X. et al. *Fitoterapia*, **2010**, 81, 910–913, doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.003.

4. Stepanova E.V., et al. *Carbohydr. Res.*, **2014**, 388, 105–111, doi: 10.1016/j.carres.2014.02.014.

## Особенности организации генных кластеров биосинтеза О-полисахаридов бактерий рода *Ochrobactrum*

Бурьгин Г.Л.<sup>1,2</sup>, Пономарева Т.С.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

<sup>3</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

E-mail: burygingl@gmail.com

Бактерии рода *Ochrobactrum* (таксономическая группа *Brucella/Ochrobactrum*) широко распространены в природе и представляют практический интерес как для медицинской микробиологии, так и для экологической и агрономической биотехнологии. При этом только для 4-х штаммов этой группы бактерий имеются данные о структурах О-полисахаридов.

В данной работе были проведены анализ геномов 17 типовых штаммов рода *Ochrobactrum*, представленных в базе данных GenBank, для выявления генных кластеров биосинтеза О-полисахаридов (ГКО) и сравнение генного состава выявленных участков геномов разных штаммов.

В результате биоинформатического анализа геномов бактерий рода *Ochrobactrum*, сопоставленного с литературными данными о структурах О-полисахаридов штаммов *O. anthropi* LMG3331 [1], *O. rhizosphaerae* PR1 [2], *O. cytisi* ESC1 [3] и *O. cytisi* IPA7.2 [4], для 16 штаммов (всех, кроме *O. gallinifaecis* ISO 196) были выявлены участки геномов, содержащие все необходимые гены для биосинтеза О-полисахаридов: гены биосинтеза нуклеозидных предшественников моносахаридов, гликозилтрансфераз и процессинга О-полисахарида. Было предположено, что выявленные участки геномов являются ГКО этих бактерий. Протяженность ГКО бактерий рода *Ochrobactrum* оказалась весьма большой: от 27463 п.о. у *O. daejeonense* DSM 26944 до 57487 п.о. у *O. anthropi* LMG3331. Обязательными филогенетически консервативными элементами ГКО являлись гены инициации синтеза повторяющихся звеньев (*wzd* и *wbpL*, расположенные на 5'-концах кластеров) и гены синтеза dTDP-L-Rha (вблизи 3'-концов кластеров). Также установлено, что процессинг О-полисахаридов кодируют гены белков Wzm и Wzt (АТФ-зависимые АВС-транспортёры), а терминацию синтеза полисахаридной цепи обеспечивают специфические метилтрансферазы.

Данные о генетике О-полисахаридов бактерий рода *Ochrobactrum* будут полезны в понимании процессов коэволюции данных прокариот с животными, растениями и другими бактериями.

### Список литературы:

1. Velasco J., Moll H., Vinogradov E.V., Moriyón I., Zähringer U. Determination of the O-specific polysaccharide structure in the lipopolysaccharide of *Ochrobactrum anthropi* LMG 3331. Carbohydr. Res. (1996). DOI: 10.1016/0008-6215(96)00068-7
2. Szpakowska N., Kowalczyk A., Jafra S., Kaczyński Z. The chemical structure of polysaccharides isolated from the *Ochrobactrum rhizosphaerae* PR17T. Carbohydr. Res. (2020). DOI: 10.1016/j.carres.2020.108136
3. Pac M., Komanińska I., Zamlyńska K., Turska-Szewczuk A., Choma A. Structure of the O-specific polysaccharide from the legume endosymbiotic bacterium *Ochrobactrum cytisi* strain ESC1T. Carbohydr. Res. (2015). DOI: 10.1016/j.carres.2015.05.002

4. Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdrovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Int. J. Biol. Macromol. (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.017

## **Влияние условий деацетилирования на физико-химические свойства хитозана из панциря ракообразных**

*Долгопятова Н.В.<sup>1</sup>, Новиков В.Ю.<sup>2</sup>, Кучина Ю.А.<sup>1</sup>, Коновалова И.Н.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>ФГАОУ ВО "МГТУ", Мурманск, Россия*

*<sup>2</sup>Полярный филиал ФГБНУ "ВНИРО" ("ПИИРО" им. Н.М. Книповича), Мурманск, Россия*

*Email: dolgopyatova.nv@yandex.ru*

Хитозан, получаемый деацетилированием хитина, широко применяется в медицине и различных отраслях промышленности [1]. В зависимости от областей использования требуется хитозан с различной степенью деацетилирования (СД) и молекулярной массой (ММ). При щелочном деацетилировании одновременно происходит расщепление гликозидных связей, приводящее к снижению ММ полисахарида.

Изучено влияние условий щелочного деацетилирования на СД, ММ и степень кристалличности (СК) креветочного и крабового хитозана.

Хитозан получали деацетилированием хитина в стандартных условиях: концентрация NaOH 50 %, температура  $t=95\pm 3^\circ\text{C}$ , время 60 минут [2]. Полученные в стандартных условиях образцы хитозана подвергали двух-трех- и четырехкратному деацетилированию. Изучена кинетика деацетилирования и деструкции хитозана в стандартных условиях и при насыщении реакционной смеси газообразным азотом, воздухом и кислородной смесью.

Степень деацетилирования определяли методом инфракрасной спектроскопии, молекулярную массу - вискозиметрическим методом. СК оценивали по дифрактограммам, полученным методом рентгенофазового анализа.

Установлено, что после первого деацетилирования в стандартных условиях ММ практически не изменяется, после второго и третьего - снижается в 1,5-2 раза по сравнению с молекулярной массой исходного хитина. Максимальная степень деацетилирования составила 92.0-92.5%. При насыщении реакционной смеси и без ее насыщения газообразным азотом, воздухом и кислородной смесью степень деацетилирования достигает постоянных значений через 60 минут от начала реакции и составляет 80-83%. В этих условиях степень кристалличности хитозана незначительно изменяется и составляет 46-52%.

При деацетилировании в атмосфере азота ММ хитозана практически не изменяется. Растворенный молекулярный кислород приводит к окислительной деструкции полисахарида и снижению ММ. Полученные результаты могут быть использованы для регулирования ММ хитозана независимо от его степени деацетилирования, поскольку СД не зависит от присутствия кислорода в реакционной смеси.

*Список литературы:*

1. Chitin and Chitosan: History, Fundamentals and Innovations / Eds. G. Crini & E. Lichtfouse. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 343 p.

2. Новиков, В.Ю., Коновалова, И.Н., Долгопятова, Н.В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. СПб : ГИОРД, 2012

## Разработка синтеза Куркулигозида

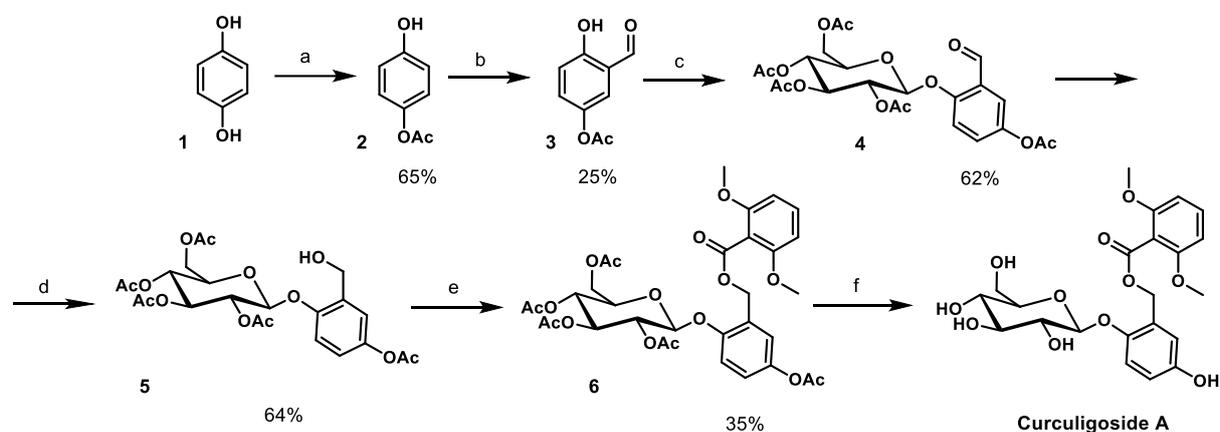
*Дорошенко И.А., Степанова Е.В.*

ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, Россия

E-mail: [Ivan220597@mail.ru](mailto:Ivan220597@mail.ru)

Куркулигозид А (Curculigoside A) – это природный глюкозид, содержащий один остаток глюкозы. Он был выделен из *Curculigo orchioides* (Куркулиго орхидеевидное) и на данный момент является многообещающей молекулой природного происхождения для медицинского использования. Установлено, что он индуцирует ангиогенез в церебральных эндотелиальных клетках, соответственно может являться потенциальным нейроваскулярным восстанавливающим средством при инсульте и травмах головного мозга.[2] Также он способствует пролиферации стромальных клеток костного мозга (BMSC) и индуцирует остеогенную дифференцировку BMSC, следовательно, потенциально может являться средством против остеопороза. [3] Куркулигозид А обладает ингибирующим эффектом образования фибрилл при болезни Альцгеймера [4] и проявляет сильную антиоксидантную активность к клеткам SY5Y, которые являются адренергическими по фенотипу, но также экспрессируют дофаминергические маркеры, что может быть использовано при изучении механизма болезни Паркинсона и ее предотвращения. [5]

На сегодняшний день отсутствует методика синтеза природного гликозида Куркулигозида А. Данный гликозид был выделен в крайне малых количествах (712 мг.) из *C. orchioides* из 200 кг. высушенного растительного сырья. [1] Разработка синтеза позволит получать Куркулигозид А в больших количествах более простым и экономически выгодным способом, а также вещество будет химически чистым, что позволит дальнейшее изучение его биологической активности и применение его в медицине.



а) Уксусная кислота, уксусный ангидрид, 110 °С, 2 h; б) Трифторуксусная кислота, уротропин, 75 °С, 1,5 h; в) Ацетобромглюкоза, оксид серебра, хинолин, 25 °С, 1 h; г) Борогидрид натрия, ЦТМАБ, вода, дихлорметан, 25 °С, 1 h; д) 2,6-диметоксибензойная кислота, N, N'-дициклогексилкарбодиимид, 4-диметиламинопиридин, дихлорметан, 25 °С, 12h; е) Метилат натрия, метанол, 25 °С, 1 h.

### Схема синтеза Куркулигозида А

Основной целью работы является разработка экономически выгодного синтеза для получения химически чистых видов Куркулигозида.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №21-73-10211

*Список литературы:*

1. Zuo, A. X., Shen, Y., Jiang, Z. Y., Zhang, X. M., Zhou, J., Lü, J., & Chen, J. J. Three new phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* G. *Fitoterapia* (2010). DOI: [10.1016/j.fitote.2010.06.003](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.003)
2. Kang, Z., Zhu, H., Luan, H., Han, F., & Jiang, W. Curculigoside A induces angiogenesis through VCAM-1/Egr-3/CREB/VEGF signaling pathway. *Neuroscience* (2014). DOI: [10.1016/j.neuroscience.2014.02.050](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.050)
3. Qingping Shen, Deliang Zeng, Yong Zhou, Lunguo Xia, Yanfan Zhao, Guangyang Qiao, Lianyi Xu, Yan Liu, Ziyuan Zhu, Xinquan Jiang. Curculigoside promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2013). DOI: [10.1111/jphp.12054](https://doi.org/10.1111/jphp.12054)
4. Rivière, C., Richard, T., Vitrac, X., Mérillon, J. M., Valls, J., & Monti, J. P. New polyphenols active on  $\beta$ -amyloid aggregation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* (2008). DOI: [10.1016/j.bmcl.2007.11.028](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.028)
5. Zhou, X. J., Mei, R. Q., Zhang, L., Lu, Q., Zhao, J., Adebayo, A. H., & Cheng, Y. X. Antioxidant phenolics from *Broussonetia papyrifera* fruits. *Journal of Asian natural products research* (2010). DOI: [10.1080/10286020.2010.481260](https://doi.org/10.1080/10286020.2010.481260)

## Влияние триизопропилсилильной группы на изомеризацию производных D-манно- и D-глюкопиранозы с образованием D-фруктофуранозы

*Карпенко М.Ю., Аброна П. И., Зинин А. И., Кононов Л.О.*

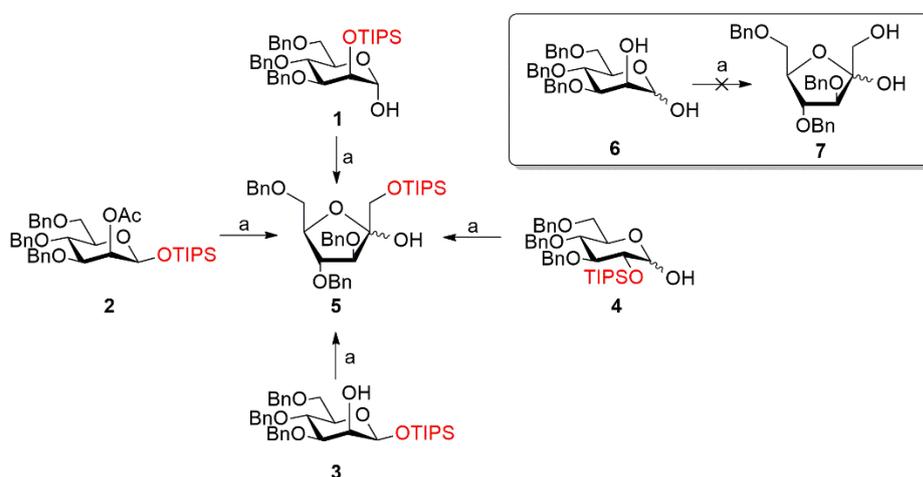
*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Российская Федерация*

*E-mail: m.karpenko96@mail.ru*

Фрагменты фруктофуранозы являются составной частью природных фруктанов, таких, как инулин, поэтому синтез частично защищенных фруктофуранозидов является актуальной задачей.

Несмотря на то, что изомеризация незащищенных маннопиранозы и ее эпимера глюкопиранозы в фруктофуранозу широко известна (реакция Лобри де Брюина – Альберда ван Экенштейна), в литературе обнаружен лишь единственный пример образования 3,4,6-три-*O*-бензил-D-фруктофуранозы в качестве побочного продукта (выход 8%) из 3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозы в основных условиях ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ) [1].

Мы исследовали влияние триизопропилсилильной (TIPS) группы на изомеризацию производных D-маннопиранозы (1–3) и D-глюкопиранозы 4 в производное D-фруктофуранозы 5 в основных условиях (MeONa, MeOH) при нагревании (выход фруктофуранозы 5 составлял 13–33% в зависимости от условий реакции).



**Схема 1.** Реагенты и условия: *a.* 57 mM MeONa, MeOH, 25–60 °C.

Следует отметить, что образования D-фруктофуранозы 7 из 3,4,6-три-*O*-бензил-D-маннопиранозы (6) в этих условиях не наблюдается, что указывает на важность присутствия силильной группы при *O*-2 для успешного протекания данного процесса.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00465-а).

### Список литературы:

1. S. Meng, et al. b-mannosylation through o-alkylation of anomeric cesium alkoxides: Mechanistic studies and synthesis of the hexasaccharide core of complex fucosylated n-linked glycans. (2020). DOI: 10.1002/ejoc.202000313.

**Влияние удаленных групп на результат реакции гликозилирования:  
концепции, компьютерное моделирование, химический эксперимент**

*Кононов Л.О.*

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, Москва, Российская федерация  
E-mail: leonid.kononov@gmail.com*

Влияние удаленных групп в молекулах *гликозил-доноров* [1] и *гликозил-акцепторов* [1, 2] на результат реакции гликозилирования считается хорошо установленным фактом. В докладе будет сделана попытка критически проанализировать как литературные данные, так и собственные (не)опубликованные результаты с привлечением различных методических подходов.

Будут рассмотрены известные гипотезы [1, 3, 4], призванные объяснить феномен влияния удаленных групп в молекулах *гликозил-доноров*, включая (1) соучастие ацильных групп [4] или (2) предпочтительную стабилизацию электроноакцепторными заместителями различных конформеров гликозил-катиона. Будут обсуждены ограничения компьютерного моделирования влияния удаленных групп на стабильность гликозил-катиона, которые связаны с в первую очередь с проблемой корректного выбора стартовых геометрий при оптимизации конформаций гликозил-катионов со сложными заместителями в пиранозном цикле.

Будет показано, что концепции, связывающие результат гликозилирования с нуклеофильностью гидроксильной группы *гликозил-акцептора* и достижимостью различных маршрутов реакции в  $S_N1-S_N2$  континууме механизмов гликозилирования [1-3], позволяют обсуждать лишь часть известных данных.

Более того, оказывается, экспериментальная проверка самого факта влияния удаленной группы в молекуле гликозил-донора или гликозил-акцептора на результат гликозилирования может приводить к противоречивым выводам, так как их относительная реакционная способность (или стереоселективность реакций с их участием) может заметно варьироваться в зависимости от концентраций реагентов и температуры проведения реакций. Рациональное объяснение имеющихся данных базируется на осознании того, что химические свойства вещества являются атрибутом не только молекулярной структуры, но и условий проведения реакций, определяющих структуру образующихся супрамеров реагентов – истинных участников химических процессов [5].

*Список литературы:*

1. *P.O. Adero, et al.* The experimental evidence in support of glycosylation mechanisms at the  $S_N1-S_N2$  interface. *Chem. Rev.* (2018). DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00083.
2. *S. van der Vorm, et al.* Acceptor reactivity in glycosylation reactions. *Chem. Soc. Rev.* (2019). DOI: 10.1039/C8CS00369F.
3. *D.M. Whitfield, J. Guo.* Proton transfer and hydrogen bonding in glycosylation reactions. *J. Carbohydr. Chem.* (2017). DOI: 10.1080/07328303.2017.1365369.
4. *B.S. Komarova, et al.* Stereocontrol of 1,2-*cis*-glycosylation by remote *O*-acyl protecting groups. In *Modern synthetic methods in carbohydrate chemistry: From monosaccharides to complex glycoconjugates*, D.B. Werz, S. Vidal, Eds., Wiley-VCH: Weinheim (2014). pp. 125-160.

5. *L.O. Kononov*. Chemical reactivity and solution structure: On the way to a paradigm shift? RSC Adv. (2015). DOI: 10.1039/c4ra17257d.

**Химические модификации ламинаранов бурых водорослей с целью получения высокоактивных противоопухолевых соединений**

*Маляренко О.С.<sup>1</sup>, Суриц В.В.<sup>1</sup>, Ермакова С.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток, Россия*

*E-mail: malyrenko.os@gmail.com*

Бурые водоросли наряду с другими полисахаридами, содержат ламинараны (1,3;1,6-β-D-глюканы), обладающие комплексной биологической активностью. Большинство ламинаранов бурых водорослей, равно как и их производные, остаются неизученными с точки зрения биологической активности, что представляет собой незаполненную нишу в теоретических познаниях и скрывает в себе потенциал получения целого ряда препаратов с широким спектром биологической активности.

Цель данной работы – получение сульфатированных и аминированных производных ламинаранов бурых водорослей *Saccharina cichorioides* и *Dictyota dichotoma*, определение противоопухолевой и радиосенсибилизирующей активностей нативных и модифицированных полисахаридов и установление молекулярного механизма их действия.

Сульфатированный ламинаран из бурой водоросли *Dictyota dichotoma* был получен с использованием сульфатирующей смеси, представляющей собой комплекс «триоксид серы-диметилформамид» в безводной среде. Структура модифицированного ламинарана была исследована с помощью методик 1D и 2D спектроскопии ЯМР. Установлено, что сульфатные группы в модифицированном ламинаране находятся в С2, С4 и С6 положениях.

Ламинаран из *Saccharina cichorioides* был химически модифицирован в ходе реакции присоединения аминогрупп к эпоксиактивированному полисахариду. Определено, что аминированный ламинаран представляет собой бета-D-глюкан с основной цепью из 1,3-связанных остатков глюкозы и ответвлениями по С6 в виде единичных остатков глюкозы, часть из которых замещена по С6 группой –CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Было проведено комплексное исследование противоопухолевой активности нативных ламинаранов и их производных на моделях выживаемости (MTS метод), формирования колоний (метод мягких агаров) и миграции («скрэтч» метод) клеток меланомы, рака толстого кишечника и молочной железы человека. Показано, что сульфатированный ламинаран проявляет значительную противоопухолевую активность по отношению к клеткам меланомы, а аминированный ламинаран - по отношению к клеткам рака молочной железы человека. Установлено, что модифицированные ламинараны эффективно повышают чувствительность опухолевых клеток к радиации, а нативные ламинараны защищают здоровые клетки организма от излучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-74-00016.

## Синтез новых сиалил-доноров и их реакции с простыми спиртами без добавления промотора

*Мамиргова З.З.<sup>1</sup>, Кононов Л.О.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия*

*E-mail: zarina\_96@list.ru*

Получение и биомедицинское исследование гликоконъюгатов, олигосахаридов и их аналогов, содержащих сиаловые кислоты [1], является важной областью исследований, направленных на понимание их биологических ролей и определение их терапевтической значимости.

Синтез гликозидов сиаловых кислот с природной  $\alpha$ -конфигурацией представляет собой трудную задачу из-за отсутствия стереоконтролирующих групп. Хотя недавно было показано, что возможно стереоселективное  $\alpha$ -сиалилирование, протекающее через образование гликозил-катиона по  $S_N1$ -подобному маршруту [2], более перспективными считаются подходы, в которых гликозилирование протекает по  $S_N2$ -подобному маршруту [3, 4].

Целью данной работы было получение сиалил-доноров с такими защитными группами, которые способны дестабилизировать гликозил-катион. Это обеспечило бы протекание реакций по  $S_N2$ -подобному маршруту и, следовательно, более высокую стереоселективность по сравнению с  $S_N1$ -подобным маршрутом, идущим через образование гликозил-катиона. Руководствуясь такими соображениями, мы синтезировали сиалилхлориды и сиалилбромиды с *O*-хлорацетильными и *O*-трифторацетильными, а также с *N*-ацетильными и *N*-трифторацетильными защитными группами в различных сочетаниях. Полученные сиалил-доноры были введены в реакции с метанолом и изопропиловым спиртом. С метанолом реагируют как сиалилхлориды, так и сиалилбромиды, давали метилгликозиды с высокими выходами (до 85% для сиалилхлоридов и до 100% для сиалилбромидов) и стереоселективностями ( $\alpha:\beta \leq 19.5:1$  для сиалилхлоридов и  $\alpha:\beta \leq 13:1$  для сиалилбромидов). С изопропиловым спиртом, как и ожидалось, сиалилхлориды *без добавления промотора* в реакцию не вступают, тогда как сиалилбромиды реагируют с ним в течение 90 мин, давая изопропилгликозиды с выходами до 89% и низкой стереоселективностью ( $\alpha:\beta \leq 1.6:1$ ). Важно отметить, что ранее не сообщалось о реакциях сиалилбромидов со вторичными спиртами в отсутствие промоторов.

### *Список литературы:*

1. C. Navuluri, D. Crich. Stereocontrolled synthesis of sialosides. In Glycochemical synthesis: Strategies and applications, S.-C. Hung, M.M.L. Zulueta, Eds., John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken (2016). DOI: 10.1002/9781119006435.ch5.
2. N. Komura, et al. Constrained sialic acid donors enable selective synthesis of  $\alpha$ -glycosides. Science (2019). DOI: 10.1126/science.aaw4866.
3. J.-S. Sun, et al. The 1-picolinyl-5-azido thiosialoside: A versatile donor for stereoselective construction of sialyl linkages. Angew. Chem. Int. Ed. (2019). DOI: 10.1002/anie.201909177.
4. P.O. Adero, et al. The experimental evidence in support of glycosylation mechanisms at the  $S_N1-S_N2$  interface. Chem. Rev. (2018). DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00083.

**Pulse-chase подход как ключ к пониманию процессов инициации биосинтеза и постсинтетических модификаций растительных полисахаридов**

*Микшина П.В., Чемикосова С.Б., Горшкова Т.А.*

*КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

*E-mail: mikshina@kibb.knc.ru*

Процессы биосинтеза и постсинтетических модификаций растительных полисахаридов со стремительным нарастанием привлекают внимание гликобиологов. Причины этого не только в желании понять, как, где, когда и для чего эти процессы происходят в растениях, но и в стремлении научиться воспроизводить разнообразные сложные растительные углеводы искусственным путем.

Существенное развитие методов молекулярной биологии привело к выявлению целого ряда «молекулярных станций», вовлеченных в биосинтез различных полисахаридов клеточной стенки, обнаружению регуляторов, координирующих этот процесс, и ферментов, модифицирующих синтезированные углеводные структуры. Сформированные на сегодня подходы для выявления углевод-синтезирующих и модифицирующих ферментов, и комплексов и появление решений для демонстрации их активности позволяют говорить, что расшифровка механизмов наращивания и модификаций углеводных цепей различного типа – это вопрос времени. При этом для большинства полисахаридов, в том числе при выявленных синтезирующих и модифицирующих ферментах и регуляторах, до сих пор ничего неизвестно об инициации биосинтеза и о временных рамках процессов постсинтетических модификаций. Одна из причин этого – недооценка и слабое привлечение подходов, позволяющих отслеживать «судьбу» полисахаридов с момента их зарождения до обретения последнего пристанища в клеточной стенке.

В докладе будут представлены возможности pulse-chase подхода в сочетании с хроматографическими методами для отслеживания полного жизненного пути индивидуального полисахарида в интактных растениях. Суть pulse-chase подхода, как основной платформы для оценки временных событий, происходящих с индивидуальным полимером, состоит в анализе характера перераспределения радиоактивной метки, полученной растениями после короткого «глотка»  $^{14}\text{CO}_2$  в ходе фотосинтеза (pulse-период) и метаболизируемой ими в ходе дальнейшего роста в отсутствие меченого субстрата (chase-период).

Работа частично поддержана проектом РНФ № 20-14-00335.

## Генная инженерия растительных клеточных стенок

*Мокишина Н.Е., Горшкова Т.А.*

*КИББ-обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Растительная клеточная стенка – многофункциональная динамичная структура, основу которой составляют полисахариды. Типы, состав, структура клеточных стенок довольно хорошо изучены как на биохимическом, так и на молекулярно-генетическом уровнях. Современная молекулярная биология растений сместила фокус интересов от структурных генов в сторону исследования регуляторов изучаемых процессов, в число которых, в первую очередь, входят факторы транскрипции, что существенно повышает эффективность генно-инженерных манипуляций.

Самыми изученными на сегодняшний день являются факторы транскрипции, регулирующие формирование вторичной клеточной стенки, которая составляет основную массу древесины. Растительные волокна могут формировать третичную клеточную стенку (волокна льна, конопли, рами). Высокое содержание целлюлозы на фоне низкого содержания лигнина делают растительные волокна с третичной клеточной стенкой перспективным сырьем для конверсии. При этом факторы транскрипции, регулирующие биосинтез третичной клеточной стенки, до сих пор не выявлены. Их открытие может стать важным этапом в понимании механизмов формирования клеточной стенки в целом, а также расширит возможности генно-инженерных манипуляций, направленных на создание растительного сырья с заданными свойствами. Удобной модельной системой для исследования факторов транскрипции стали мутанты *nst1nst3* резуховидки [1]. В этих мутантах межпучковые волокна не формируют вторичную клеточную стенку. В докладе будут рассмотрены результаты применения этой модели для выявления роли транскрипционных факторов, регулирующих развитие утолщенных клеточных стенок, а также примеры изменения клеточных стенок без привлечения факторов транскрипции. Расшифровка механизмов формирования различных типов клеточных стенок уже сейчас позволяют ученым создавать "химерные" структуры, которые не вписываются в существующие "классические" концепции типов клеточных стенок.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФ №20-44-07005.

[1] –Mitsuda N., Iwase A., Yamamoto H. et al. (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. Plant Cell 19, 270–280.

**Создание ферментов с улучшенными свойствами методами направленной эволюции на примере глюкоамилазы гриба *A. awamori***

*Шмидт А.Е.<sup>1,2</sup>, Соболева Е.В.<sup>1,3</sup>, Швецов А.В.<sup>1,2,3</sup>, Сергеев В.Р.<sup>1,2</sup>, Суржик М.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*

<sup>2</sup>*НИЦ «Курчатовский институт», Москва*

<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург*

Глюкоамилаза (ГА, КФЗ.2.1.3) - гликозид-гидролаза семейства GH15, катализирующая реакцию гидролиза  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-гликозидных связей в полимерах и олигомерах глюкозы.

Глюкоамилаза в составе различных ферментативных смесей широко используется в пищевой промышленности и при производстве биоэтанола. Несмотря на высокую термостабильность, глюкоамилазы из гипертермофильных бактерий не применяются в промышленном производстве из-за своей сравнительно низкой активности. Вместо этого используется глюкоамилаза гриба *A. awamori*, которая имеет высокую активность при кислых значениях pH и при 37-60°C, но необратимо инактивируется при более высоких температурах. Однако данный фермент не удовлетворяет жестких требований современных промышленных биореакторов, так как большинство технологических процессов проходят при температурах выше 80°C и при нейтральных значениях pH. Таким образом, получение термостабильной глюкоамилазы с pH-оптимумом в области нейтральных значений позволит осуществлять одностадийный комбинированный гидролиз полисахаридов, что приведет к уменьшению себестоимости конечных продуктов.

Для получения мутантных форм ГА с увеличенной термостабильностью или pH-оптимумом в нейтральных значениях нами использовались методы компьютерного моделирования и направленной эволюции. С помощью молекулярной динамики были найдены регионы белка, замена в которых приводила бы к увеличению термостабильности или к сдвигу pH-оптимума. ДНК-библиотеки получали с помощью случайного и сайт-насыщающего мутагенеза.

В результате скрининга нами были получены несколько мутантных форм ГА с повышенной термостабильностью, а также две мутантные формы с измененным pH-оптимумом. Аминокислотные замены этих мутантных форм использовались при создании химерного белка с увеличенной термостабильностью и сдвинутым pH-оптимумом в область нейтральных значений с помощью *in vitro* рекомбинации. Далее были определены кинетические и термодинамические характеристики полученных химерных глюкоамилаз.

## Ключевое влияние способа смешения на результат гликозилирования: выход и стереоселективность

*Мячин И.В.<sup>1</sup>, Степанова Е.В.<sup>1,2</sup>, Кононов Л.О.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup>Томский политехнический университет, Томск, Российская Федерация

E-mail: [ilyatyachin@ioc.ac.ru](mailto:ilyatyachin@ioc.ac.ru)

Углеводы и гликоконъюгаты играют важную роль в биологических процессах [1]. Одним из актуальных подходов к синтезу олигосахаридов для конъюгации с белками является использование Янус-агликонов [2], которые могут выполнять роли как временной защитной группы аномерного положения сахара, так и (пре)спейсера для синтеза гликоконъюгатов. Таким агликоном является и 4-(3-хлорпропокси)фенильная группа (СРР). Ранее была синтезирована серия моно- и олигосахаридов с СРР-агликоном [2], но в ней отсутствовали гликозиды *N*-ацетилнейраминовой кислоты. Учитывая важность гликоконъюгатов, в состав которых входят производные сиаловых кислот [3], мы решили восполнить этот пробел и синтезировать СРР-сиалозид **2** (схема 1).

**Схема 1.** Реагенты и условия: а. СРР-ОН,  $\text{V}_{14}\text{NHSO}_4$ ,  $\text{AcOEt}$ , 10% водн.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Ранее было показано, что гликозилирование фенолов сиалилхлоридом **1** в условиях межфазного катализа (МФК) протекает стереоспецифично с образованием  $\alpha$ -сиалозидов [4]. И действительно, исследуемая реакция в колбе ( $C(\mathbf{1}) = 50 \text{ мМ}$ ) приводила только к  $\alpha$ -сиалозиду **2 $\alpha$** , но с малым выходом (13%). Зная, что изменение способа смешения (в потоке или в колбе) может сильно влиять на результат реакции (это т. н. «микрофлюидный эффект» [5]), мы провели серию реакций в проточном реакторе (Comet X-01, скорость потока 2 мкл/мин) в широком диапазоне концентраций (5–200 мМ). Удалось добиться почти трехкратного увеличения выхода СРР-сиалозидов **2** при той же концентрации сиалилхлорида **1** (35%), однако стереоселективность реакций, проводимых в потоке, сильно меняется: в качестве минорного компонента образуется  $\beta$ -сиалозид **2 $\beta$**  ( $\alpha:\beta = 6.0:1 - 10.6:1$ ); кроме того, выход СРР-сиалозидов **2** резко падает при низких (<50 мМ) концентрациях. Таким образом, показано ключевое влияние способа смешения на стереоселективность гликозилирования, а концентрации – на реакционную способность реагентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20164).

### Список литературы:

1. A. Varki et al. (eds.), Essentials of glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 3rd edn., (2015–2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274>.
2. E.V. Stepanova et al. Janus glycosides of next generation: Synthesis of 4-(3-chloropropoxy)phenyl and 4-(3-azidopropoxy)phenyl glycosides. Carbohydrate Research (2019). DOI: 10.1016/j.carres.2018.11.013.
3. R. Schauer. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Current Opinion in Structural Biology (2009). DOI: 10.1016/j.sbi.2009.06.003.
4. R. Roy. Phase transfer catalysis in carbohydrate chemistry. In Handbook of Phase Transfer Catalysis, Y. Sasson and R. Neumann (eds.), Springer, Dordrecht (1997). DOI: 10.1007/978-94-009-0023-3\_7.

5. *L.O. Kononov*. Chemical reactivity and solution structure: on the way to a paradigm shift?  
RSC Advances (2015). DOI: 10.1039/c4ra17257d.

## **Полисахаридный эррей для поиска и характеристики углевод-связывающих белков растений**

*Никифорова А.В.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Нокель А.Ю.<sup>1,2</sup>, Ахметгалиева А.Ф.<sup>3</sup>, Головченко В.В.<sup>4</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>,*

*<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия*

*<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия*

*<sup>3</sup>ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия*

*<sup>4</sup>ФГБУН Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия*

*E-mail: nikiforovaalica@gmail.com*

В геноме растений записано множество углевод-связывающих белков (УСБ), однако только часть из них охарактеризована. Максимально полная информация об УСБ имеет важное значение, открывая возможности для регулирования процессов биосинтеза в растениях. В связи с этим целью данной работы является разработка полисахаридного эррея для поиска новых и детальной характеристики уже известных УСБ.

Технология эрреев является незаменимой для решения подобных задач, поскольку позволяет анализировать объект по сотням специфичностей в одном эксперименте. Для нашего исследования был напечатан полисахаридный эррей (ПЭ), содержащий 113 охарактеризованных пектиновых полисахаридов (ПС), выделенных из различных растений. Факт иммобилизации ПС подтверждали с помощью набора коммерческих растительных лектинов известной специфичности, стандартной плазмы крови человека, и моноклонального антитела INRA-RU2, распознающего остов рамногалактуронана I. Обнаружено, что лектины известной моно- и олигосахаридной специфичности способны взаимодействовать с ПС, иногда не имеющими структурного сходства с описанными в литературе лигандами: например, ризин, известный как  $\beta$ -Gal-связывающий лектин, взаимодействовал с 23 из 113 полисахаридов, в том числе с ксилоглюканом из тамаринда, галактоманнаном из кэроба, в составе которых преобладают глюкоза и манноза соответственно. Другой пример - вискумин, распознающий как  $\beta$ -Gal, так и сиалилированные, сульфатированные структуры, связывался, в том числе, с полисахаридами, в составе которых преобладают арабиноза и уроновые кислоты. Таким образом, результаты, полученные с помощью разработанного полисахаридного гликоэррея, свидетельствуют о том, что общепринятая специфичность коммерческих лектинов требует пересмотра и более детального изучения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-63-47110.

## Поляриметрия как метод изучения структуры растворов углеводов

*Орлова А. В., Кононов Л. О.*

*Институт органической химии им Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Российская Федерация*

*E-mail: zzzoka@gmail.com*

Известно, что растворы низкомолекулярных веществ могут содержать области сгущения (домены растворов, супрамеры), включающие в себя как молекулы растворенного вещества, так и растворителя [1]. Можно ожидать, что супрамеры, состоящие из молекул в иной конформации или отличающиеся способом их упаковки, будут различаться и величинами удельного вращения.

Подробное исследование возможности применения поляриметрии для изучения структуры растворов мы проводили на водных растворах D-левоглюкозана (1,6-ангидро-D-глюкозы), молекулы которого обладают жесткой структурой, что упрощает квантово-химические расчеты, с помощью которых удалось показать [2], что значительные изменения величины оптического вращения могут быть вызваны изменениями микроокружения молекулы левоглюкозана.

Изучение структуры водных растворов левоглюкозана с помощью поляриметрии показало [2], что в этих растворах существуют «критические» концентрации [2, 3], при которых происходит перестройка «супрамеров».

При изучении влияния изменений температуры на структуру раствора левоглюкозана на одной из «критических» концентраций (0.1 М) [2] обнаружена «критическая» температура при 30 °С [4]. Эта температура совпадает с «критической» температурой, которую мы обнаружили ранее при исследовании 0.2 М водного раствора аллиллактозида, хотя в случае раствора левоглюкозана эффект гораздо более заметен.

Это, по-видимому, указывает на общую причину данного явления. Не исключено, что скачкообразные изменения величины удельного вращения водных растворов углеводов при изменении температуры отражают существенные изменения в структуре воды [5], а молекулы хиральных растворенных веществ (углеводов) выполняют функцию зондов, «чувствующих» малейшие изменения своей конформации или перестройки окружения (в «клетке» растворителя), что на макроскопическом уровне проявляется как изменение величины удельного вращения (см. [3] и указанные там ссылки).

### *Список литературы:*

1. *L.O. Kononov*, Chemical Reactivity and Solution Structure: On the Way to a Paradigm Shift?, RSC Adv. (2015). DOI: 10.1039/c4ra17257d.
2. *A.V. Orlova, R.R. Andrade, C.O. da Silva, A.I. Zinin, and L.O. Kononov*, Polarimetry as a Tool for the Study of Solutions of Chiral Solutes, ChemPhysChem, (2014). DOI: 10.1002/cphc.201300894.
3. *M.O. Nagornaya, A.V. Orlova, E.V. Stepanova, A.I. Zinin, T.V. Laptinskaya, and L.O. Kononov*, The use of the novel glycosyl acceptor and supramer analysis in the synthesis of sialyl- $\alpha$ (2–3)-galactose building block, Carbohydr. Res., (2018). DOI: 10.1016/j.carres.2018.10.001.
4. *A.V. Orlova, L.O. Kononov*, Polarimetry as a method for studying the structure of aqueous carbohydrate solutions: correlation with other methods. Rensit (2020). DOI: 10.17725/rensit.2020.12.095.

5. *B. Bagchi*, Water in biological and chemical processes: from structure and dynamics to function. Cambridge University Press: Cambridge, (2013), 356 p.

## Дисфункция гликозидаз при наследственных заболеваниях человека.

### Подходы к лечению.

*Пчелина С.Н.<sup>1</sup>, Захарова Е.Ю.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г.Гатчина

<sup>2</sup>Медико-генетического научный центр им. Н.П. Бочкова, Москва

*E-mail:pchelina\_sn@npi.nrcki.ru*

Гликозидазы – ферменты, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах углеводов. В различных компартментах эукариотической клетки с нарушением функций гликозидаз лизосом (кислых гидролаз) связан ряд наследственных заболеваний у человека, называемых лизосомными болезнями накопления (ЛБН). В настоящее время описано около 70 заболеваний человека, относящихся к этой группе моногенных болезней. Преимущественно – это аутосомно-рецессивные заболевания, связанные с мутациями в генах кислых гидролаз, приводящих к снижению активности ферментов и накоплению нерасщепленных субстратов. Изучение молекулярных основ этих болезней активно начался с конца 90-х гг. прошлого. Настоящим прорывом в диагностике следует считать конец XX в., когда активность ферментов лизосом научились определять в пятнах высушенной крови и прошли первые исследования по изучению частоты этих болезней в популяциях. В 1970-х гг. была высказана идея о возможности применения для лечения ЛБН фермент-заместительной терапии.

Наиболее распространенная из ЛБН является болезнь Гоше, связанная со снижением активности глюкоцереброзидазы, и накоплением глюкоцереброзида, который в организме человека, в результате реакции деацетилирования превращается в лизосфинголипид, глюкозилсфингозин. Оценка накопления глюкозилсфингозина в крови в настоящее время является наиболее чувствительным маркером развития болезни Гоше, и позволяет осуществлять мониторинг ответа на терапию.

В настоящее время для ряда ЛБН разработана фермент-заместительная терапия. Метод является дорогостоящим, требует регулярного введения рекомбинантного фермента пациенту внутривенно и неэффективен при неврологических формах болезней. Сегодня для лечения ЛБН рассматриваются новые стратегии, применение новых технологий доставки фермента через гематоэнцефалический барьер, а также фермент - индуцирующая терапия фармакологическими шаперонами. Этот особый подход предложен для лечения наследственных заболеваний, при которых нарушаются сворачивание (фолдинга) белка и его доставка в определенный компартмент клетки.

В докладе будут обсуждены типы мутационных повреждений приводящих к развитию заболеваний, спектр клинических проявлений ЛБН, связь патогенеза ЛБН с развитием нейродегенеративных заболеваний, в частности с болезнью Паркинсона. На примере результатов собственных исследований представлены данные как молекулярный докинг *in silico* дает возможность разработки новых фармакологических шаперонов, а первичная культура макрофагов, полученная из крови пациентов, позволяет осуществлять скрининг индивидуального ответа пациента на препарат *in vitro*.

Исследование поддержано грантом РНФ 19-15-00315.

**Синтез гептасахарида А (тип 3) — антигена подгруппы крови А1**  
*Рыжов И.М.<sup>1</sup>, Савченко М.С.<sup>1</sup>, Саблина М.А.<sup>1</sup>, Попова И.С.<sup>1</sup>, Тыртыши Т.В.<sup>1</sup>,  
Бовин Н.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской  
академии наук, Москва, Российская Федерация  
E-mail: imryzhov@gmail.com*

Гептасахарид А (тип 3), имеющий структуру  $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2]\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2]\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta$ , относится к антигенам системы групп крови АВ0. В 80-х годах прошлого века было показано, что этот антиген присутствует только на эритроцитах людей с подгруппой крови А1 [1], однако в ряде более поздних работ данное утверждение было поставлено под сомнение [2]. Для детального изучения экспрессии гептасахарида А (тип 3) на А-эритроцитах, относящихся к различным подгруппам, необходимо наличие такого гликана в индивидуальном виде. Поэтому целью данной работы являлся химический синтез гептасахарида А (тип 3).

Структура гептасахарида А (тип 3) включает два последовательных А-трисахаридных ( $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2]\text{Gal}\beta$ ,  $A_{\text{tri}}$ ) фрагмента (терминальный и центральный) и остаток  $\text{GlcNAc}\beta$  на восстанавливаемом конце. Получение целевого олигосахарида осуществляли из этих трех блоков. Сначала по описанной ранее методологии [3] был получен центральный А-трисахаридный блок в форме гликозил-акцептора со свободной 3-ОН-группой в звене  $\text{GalN}_3\alpha$  и триметилсилилэтильной защитой аномерного гидроксила звена  $\text{Gal}\beta$ . Полученное производное гликозилировали известным ацелированным А-трисахаридным трихлорацетимидатом [4] с хорошим выходом и  $\beta$ -стереоселективностью (85%,  $\beta/\alpha$  2.5:1). Полученный  $A_{\text{tri}}-A_{\text{tri}}$ -гексасахарид далее превращали в ацелированный трихлорацетимидат и вводили в реакцию гликозилирования с 4-ОН-азидоглюкозным гликозил-акцептором (предшественником звена  $\text{GlcNAc}\beta$ ).  $\beta$ -Стереоселективность данной реакции ( $\beta/\alpha$  1:2.3) была значительно ниже, чем описанного ранее [5] гликозилирования того же акцептора А-трисахаридным трихлорацетимидатом ( $\beta/\alpha$  1.6:1). Тем не менее, требуемый гептасахарид удалось выделить в перацелированной форме методом ВЭЖХ. Удаление защитных групп стандартными методами привело к целевому гликану. Гептасахарид А (тип 3) был синтезирован впервые.

*Список литературы:*

1. *Clausen H., Lavery S.B., Nudelman E., Tsuchiya S., Hakomori S.-I.* Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A1-specific monoclonal antibody TH-1: Chemical basis of qualitative A1 and A2 distinction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985). DOI: 10.1073/pnas.82.4.1199
2. *Svensson L., Rydberg L., de Mattos L. C., Henry S.M.* Blood group A1 and A2 revisited: an immunochemical analysis. Vox Sang. (2009). DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01112.x
3. *Корчагина Е.Ю., Бовин Н.В.* Синтез спейсерированных трисахаридов с групповой специфичностью крови А и В, их фрагментов и структурных аналогов. Биоорганическая химия (1992), т. 18, с. 283–298.

4. Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Popova I.S., Bovin N.V. Block synthesis of A tetrasaccharides (types 1, 3, and 4) related to the human ABO blood group system. Carbohydr Res. (2012). DOI: 10.1016/j.carres.2011.12.013

5. Ryzhov I.M., Korchagina E.Y., Popova I.S., Tyrtysheva T.V., Paramonov A.S., Bovin N.V. Block synthesis of A (type 2) and B (type 2) tetrasaccharides related to the human ABO blood group system. Carbohydr Res. (2016). DOI: 10.1016/j.carres.2016.04.029

## Особенности гидродинамических свойств полисахаридных комплексов природных слизей

*Сибгатуллин Т.А., Шайхиева И.З., Харина М.В., Микшина П.В.*

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН*

Слизи – чрезвычайно вязкие и клейкие растворы, образуемые семенами и корнями растений. Образующаяся вокруг семени капсула слизи на 80-85% состоит из полисахаридов, легко извлекаемых водой. Гели и гелеподобные системы на основе природных полисахаридов обладают высокой биосовместимостью и разнообразными свойствами, обусловленными, во многом, особенностями «взаимоотношений» полисахаридов и их комплексов с водой.

В этой работе с использованием комплекса биофизических подходов были проанализированы особенности пространственной организации и свойств слизи, образуемой семенами льна при набухании, и водных растворов извлекаемых из неё ключевых компонентов – рамногалактуронана I и арабиноксилана.

Методом ЯМР-релаксометрии показано, что и в слизи, и в растворах выделенных из неё полисахаридов действуют одинаковые механизмы релаксации намагниченности, но различается пространственная организация полимерной сети: в выделенных фракциях предполагается две слабо обменивающиеся фазы с различной плотностью полисахаридов, оценены размеры доменов этих фаз.

Методом ЯМР-диффузометрии обнаружен эффект ограничения диффузии воды надмолекулярными структурами. Оценены характеристические масштабы этих структур и извилистость создаваемого ими пространства пор.

Методом динамического светорассеяния показана способность полисахаридов агрегировать как в составе слизи, так и после их выделения и анализа в водных растворах.

Понижение температуры замерзания водных растворов выделенных полисахаридов, измеренное методом криоскопии, значительно больше, чем в других родственных системах. Основной вклад в это понижение обеспечивается не коллигативными свойствами раствора, а взаимодействием воды с поверхностью пор, образуемых полимерной сеткой при переходе системы в гелеподобное состояние. Оценён размер пор.

Полученные сведения позволяют рассматривать полисахариды слизи льна в качестве непроникающих криопротекторов в малых (порядка 1%) концентрациях, а также в качестве матриц для лекарственных препаратов.

## Экспериментальные подходы в исследовании надмолекулярной структуры бактериальной целлюлозы

Смыслов Р.Ю.

*Институт высокомолекулярных соединений РАН*

*НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ*

*E-mail: urs@macro.ru*

Целлюлоза наиболее распространённый биополимер на Земле и перспективный материал для применения в медицине и технике. Надмолекулярная структура (НМС) этого биополимера определяет структурные и функциональные свойства материалов, создаваемых на его основе.

Бактерии в отличие от растений заканчивают синтез целлюлозы в нанометровом диапазоне размеров, образуя нано-гель-плёнку, обладающую уникальными сорбционными свойствами за счёт иерархического строения. В результате наличия иерархии уровней организации биополимера начиная с молекулярного используют много экспериментальных физико-химических методов исследования. Для изучения бактериальной целлюлозы на каждом уровне организации – мономолекулярном, кристаллическом, полимерной сетки – используют тот подход, который даёт информацию в заданном диапазоне размеров иерархического уровня. Основными методами исследования на мезоскопическом уровне являются электронная микроскопия и методы малоуглового рассеяния нейтронов и рентгена [1, 2]. Совокупность этих методов позволяет делать выводы об иерархии надмолекулярных структур, наличия надмолекулярной полимерной сетки, представляющей перколяционный кластер. Такой жёсткий надмолекулярный каркас из макромолекул целлюлозы представляет скаффолд – «строительные леса» – на котором может строиться структура нанокпозиционного материала. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния позволяют изучать химическую модификацию на уровне макромолекул, что важно для обеспечения функциональности биополимера. Бактериальная целлюлоза – высококристаллический полимер. Рентгеновская дифракция позволяет идентифицировать степень нативности целлюлозы и делать выводы о той или иной степени её переработки.

Таким образом, возможность и умение исследовать НМС целлюлозы на разных уровнях иерархии позволяет решать фундаментальные задачи самоорганизации биополимеров, а также создавать уникальные биоматериалы для разных областей применения включая медицину и технику.

### *Список литературы:*

1. Velichko, E. V., Buyanov, A. L., Saprykina, N. N., Chetverikov, Y. O., Duif, C. P., Bouwman, W. G., & Smyslov, R. Y. High-strength bacterial cellulose–polyacrylamide hydrogels: Mesostructure anisotropy as studied by spin-echo small-angle neutron scattering and cryo-SEM. *European Polymer Journal* (2017), 88, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.034>
2. Smyslov, R. Y., Ezdakova, K. V., Kopitsa, G. P., Khripunov, A. K., Bugrov, A. N., Tkachenko, A. A., Angelov, B., Pipich, V., Szekely, N. K., Baranchikov, A. E., Latysheva, E., Chetverikov, Y. O., & Haramus, V. Morphological structure of Gluconacetobacter xylinus cellulose and cellulose-based organic-inorganic composite materials. *Journal of Physics: Conference Series* (2017), 848(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/848/1/012017>

## СИНТЕЗ ДИСАХАРИДА $Xyl\beta 1-2Man\beta$ – КОРОВОГО ФРАГМЕНТА РАСТИТЕЛЬНЫХ N-ГЛИКОПРОТЕИНОВ.

*Цыганкова С.В., Пазынина Г.В., Бовин Н.В.*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.*

*Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия*

*E-mail: svlush@mail.ru*

**Ключевые слова:** синтез олигосахаридов,  $\beta$ -маннозилрование, растительные N-гликаны.

Отличительной чертой N-гликопротеинов растений от животных является наличие  $\beta$ -ксилозного остатка, соединенного с коровой  $\alpha$ -маннозой. Наличие необычного  $Xyl$ -заместителя предполагает выполнение специфической функции в жизнедеятельности растительной клетки. И, соответственно, предполагает наличие комплементарных углевод-связывающих белков. Для их поиска, выделения и выяснения клеточной локализации были синтезированы  $Xyl$ -содержащие молекулы:  $Xyl\beta$ -osp,  $Xyl\beta 1-2Man\beta$ -sp.

Ключевой стадией синтеза дисахарида стало  $\beta$ -маннозилрование. Для получения  $\beta$ -маннозидов использовали тиогликозид с несоучаствующей группой при C2 маннозы в виде Vd или Vn. В случае диVd-тиогликозида спейсерирование проводили с использованием NIS и TfOH, а в случае Vn-производного – через бромид в присутствии AgOTf и TMM. В обоих случаях  $\alpha$ -аномера образовывалось больше, чем целевого  $\beta$ -аномера ( $\alpha/\beta \approx 2:1$ ). Постановка Vd и последующее избирательное бензоилирование с хорошим выходом привело к получению акцептора с одной OH-группой при C2. Гликозилрование бромидом ксилозы в присутствии AgOTf и TMM и последовательное снятие защитных групп осуществляли по классическим методикам, в результате получили целевой дисахарид, который затем превращали в необходимые молекулярные пробы путем конъюгации по аминокгруппе спейсера (sp = -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 20-63-47110.

**Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: структура, генетика биосинтеза, расщепление деполимеразами бактериофагов, подходы к конструированию вакцин на основе олигосахаридных фрагментов**

Шпирт А. М.<sup>1</sup>, Каратовская А. П.<sup>2</sup>, Касимова А. А.<sup>1</sup>, Арбатский Н. П.<sup>1</sup>, Шаиков А. С.<sup>1</sup>, Руденко Н. В.<sup>2</sup>, Замятина А. В.<sup>2,5</sup>, Петров Е.Л.<sup>2,5</sup>, Шнейдер М. М.<sup>2</sup>, Попова А. В.<sup>3,4</sup>, Бровко Ф. А.<sup>2</sup>, Книрель Ю. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского, Российская академия наук, 119991  
Российская Федерация, Москва, Ленинский проспект, 47

<sup>2</sup> Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, Россия, 142290 Пуцино, просп. Науки, 6

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141701 Российская Федерация, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

<sup>4</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Российская Федерация, Московская обл., г. о. Серпухов, р. п. Оболенск, территория «Квартал А», 24

<sup>5</sup> Пуцинский государственный естественно-научный институт, 142290 Российская Федерация, Московская обл., г. Пуцино, проспект Науки, 3

E-mail: [asyashpirt@gmail.com](mailto:asyashpirt@gmail.com), [asya@ioc.ac.ru](mailto:asya@ioc.ac.ru)

*Acinetobacter baumannii* является клинически значимым внутрибольничным патогеном, вызывающим пневмонию, менингит, бактериемию и другие заболевания, опасные для пациентов с ослабленной иммунной системой. Его высокая и постоянно возрастающая антибиотикоустойчивость создает серьезную проблему для здравоохранения. Одним из факторов вирулентности *A. baumannii*, в том числе высокой антибиотикоустойчивости, является капсульный полисахарид (КПС, К-антиген), образующий толстый защитный слой (капсулу) вокруг бактериальной клетки. Данная работа посвящена созданию молекулярной основы для классификации клинических изолятов *A. baumannii* по типам KL (capsule locus) и разработке на основе олигосахаридных фрагментов КПС вакцин-кандидатов для профилактики заболеваний, вызываемых этими бактериями.

Новые КПС выделяли из клеток штаммов *A. baumannii* разных типов KL, очищали гель-проникающей хроматографией и устанавливали их структуру с помощью ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Олигосахаридные фрагменты получали действием на КПС клонированных белков-деполимераз специфических бактериофагов. Для создания вакцинных препаратов олигосахариды конъюгировали с квадратной кислотой и бычьим сывороточным альбумином [1]. Иммуногенность синтезированных гликоконъюгатов тестировали на мышях линии BALB/c с использованием разработанного протокола иммунизации. Экспериментальные животные показали стабильный уровень иммунного ответа в течение десяти месяцев наблюдений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-14-00273, и Australian Research Council (ARC) DECRA Fellowship DE180101563 to J.J.K.

Список литературы:

[1] P. Xu, P. Kovacs (2019), Bacterial Polysaccharides. Methods in Molecular Biology, 1954, 89-98.

## СЕКЦИЯ «Гликаны в терапии и диагностике Covid–19»

### Ковид и группы крови

Н.В.Бовин

Институт Биоорганической химии РАН, Москва

Литература 2020 и 2021 года изобилует статьями, в которых сравнивается заражаемость коронавирусом SARS-CoV-2 пациентов с разными группами крови по системе АВО; эти данные противоречивы, хотя большая их часть согласуется в том, что пациенты группы крови А подвержены инфицированию в несколько большей степени, чем группы В, что разница незначительна – на грани статистической достоверности, и что предполагаемой причиной является взаимодействие естественных антител к антигенам групп крови с вирусом, который, как известно, сильно гликозилирован. Исследование [1] вносит ясность в этот противоречивый вопрос, оно показывает, что разница в антителах человека, направленных к гликанам А и В заразившихся пациентов, действительно незначительна. Но в то же время, наблюдается достоверная разница в антителах к антигену, известному как Tn [2], которые выявляются с помощью синтетического антигена GalNAc $\alpha$ -РАА [1]. По-видимому, анти-Tn, а не анти-А антитела участвуют во взаимодействии гуморальной системы врожденного иммунитета человека с коронавирусной инфекцией, а наблюдаемые и описанные в литературе различия в антителах к антигенам системы АВО объясняются сходством структуры антигенов Tn и А.

#### Список литературы:

1. Breiman A, Ruvoën-Clouet N, Deleers M, Beauvais T, Jouand N, Rocher J, Bovin N, Labarrière N, El Kenz H and Pendu J (2021) Low Levels of Natural Anti- $\alpha$ -N-Acetylgalactosamine (Tn) Antibodies Are Associated With COVID-19. *Front. Microbiol.* **12**:641460. doi: 10.3389/fmicb.2021.641460.
2. K.Dobrochaeva, N.Khasbiullina, N.Shilova, N.Antipova, P.Obukhova, T.Ovchinnikova, O.Galanina, O.Blixt, H.Kunz, A.Filatov, Y.Knirel, J.LePendu, S.Khaidukov, N.Bovin. Specificity of human natural antibodies referred to as anti-Tn. *Mol. Immunol.*, **120**, 74-82 (2020). doi: 10.1016/j.molimm.2020.02.005.

## Диагностические антитела к стволу участку S-белка SARS-CoV-2

Н.В.Бовин

Институт Биоорганической химии РАН, Москва

Специфические антитела пациента к коронавирусу SARS-CoV-2 содержат богатую информацию как фундаментального плана, так и медицинского – их уровень и эпитопная специфичность указывают на стадию инфекционного процесса, а также отвечают на вопрос о действенности недавно проведенной данным человеком вакцинации. Чтобы разработать специфичный тест на антитела к пептидам – фрагментам вируса, и чтобы понять, какие из антител (с какой эпитопной специфичностью) потенциально важны в качестве терапевтических, мы синтезировали 7 пептидов – фрагментов спайкового белка коронавируса, которые были теоретически предсказаны как наиболее антигенные, и в то же время, наименее экранированы густой углеводной «шубой» этого белка. Исследование этих пептидов (около 15 ак в каждом) проводилось на когорте переболевших пациентов разной степени тяжести, у которых наличие антител предварительно показано конвенционным методом. Пептиды синтезированы в виде липофильных производных, которые встраивали в эритроциты, а взаимодействие с сывороткой крови наблюдали в виде агглютинации таких эритроцитов антителами пациентов класса IgG или IgM (метод кодецитов) [1]. Параллельно, аналогичный тест ставился с помощью тестов типа ИФА с теми же семью пептидами. Кодецитный метод оказался наиболее специфичным, и, что особенно интересно и неожиданно, диагностически-значимыми оказались только антитела, направленные к стволу части (наиболее приближенной к мембране вириона) спайкового белка, то есть к антигенной детерминанте, наиболее скрытой для взаимодействия. В докладе обсуждаются причины обнаруженного явления, а также причины принципиально разного узнавания пептидов в составе кодецитов по сравнению с узнаванием тех же пептидов в виде рутинно-построенных антигенов в ИФА [2].

### Список литературы:

1. Nagappan R, Flegel WA, Srivastava K, Williams EC, Ryzhov I, Tuzikov A, Galanina O, Shilova N, Sukhikh G, Perry H, Bovin NV, Henry SM. COVID-19 antibody screening with SARS-CoV-2 red cell kodeocytes using routine serologic diagnostic platforms. *Transfusion*. 2021, **61**(4):1171-1180. doi: 10.1111/trf.16327.
2. Ryzhov IM, Tuzikov AB, Nizovtsev AV, Baidakova LK, Galanina OE, Shilova NV, Ziganshina MM, Dolgushina NV, Bayramova GR, Sukhikh GT, Williams EC, Nagappan R, Henry SM, Bovin NV. SARS-CoV-2 Peptide Bioconjugates Designed for Antibody Diagnostics. *Bioconjug Chem*. 2021 Aug 18;32(8):1606-1616. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00186. Epub 2021 Jun 28. PMID: 34181851.

**Гликонауки в создании агентов против коронавирусной инфекции и лечения  
сопутствующих осложнений**

Нифантьев Н.Э.

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН*

*E-mail: nen@ioc.ac.ru*

## Углеводная ко-рецепция вируса SARS-CoV-2

*Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Рыжиков А.Б.<sup>3</sup>, Сергеева М.В.<sup>4</sup>, Нокель А.Ю.<sup>1,2</sup>, Гордеева Е.А.<sup>1</sup>, Пазынина Г.В.<sup>1</sup>,*

*Бовин Н.В.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия*

*<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия*

*<sup>3</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия*

*<sup>4</sup>ФГБУ «Научный исследовательский институт гриппа» им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: pumatnv@gmail.com*

Уже больше двух лет SARS-CoV-2 циркулирует среди населения Земли, не сдавая своих позиций. Наилучшим способом защиты является вакцинация, однако, по ряду причин, она не может быть проведена у некоторых групп населения. В связи с этим поиск блокаторов SARS-CoV-2, альтернативных системе S-белок-ACE2, является актуальной задачей.

Известно, что коронавирусы могут использовать углеводы в качестве ко-рецепторов, поэтому совместно с НПО «Вектор» был проведен анализ углеводной специфичности рекомбинантного S-белка с помощью твердофазного анализа. Было протестировано 156 полиакриламидных гликоконъюгатов, и оказалось, что из 15 топовых специфичностей 8 – относятся к лигандам галектинов. В структуре S-белка SARS-CoV-2 есть т.н. галектиновый фолд. Однако, до сих пор связывание с N-ацетиллактозаминами или другими типичными лигандами галектинов для них не было описано. Известно также, что в организме человека углеводные цепи часто маскированы сиаловой кислотой, которая является мишенью для нейраминидазы вируса гриппа, приводя к демаскировке лактозаминовых терминаций. Выдвинуто предположение, что параллельное инфицирование вирусом гриппа может усиливать адгезию SARS-CoV-2 к респираторному эпителию.

Большинство исследований рецепторной специфичности SARS-CoV-2 посвящено изучению только S-белка, хотя он и не самый представленный белок на его поверхности. Целый вирион благодаря наличию других поверхностных белков обладает большим потенциалом для связывания с гликанами. С помощью гликоэкрена выявлено, что гликан-связывающие профили целого вируса SARS-CoV-2 и индивидуального S-белка совпадают лишь частично, хотя тенденция взаимодействовать с типичными лигандами галектинов у целого вириона сохраняется.

На основе полученной информации будет проведен компьютерный докинг лигандов в вирусный S-белок и синтез гликанов с предположительно повышенным адгезионным потенциалом к SARS-CoV-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60335).

## СЕКЦИЯ «Углевод-активные белки»

### Углевод-связывающие белки растений

Горшкова Т.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> КИББ-обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: [gorshkova@kibb.knc.ru](mailto:gorshkova@kibb.knc.ru)

Исключительное разнообразие углеводных структур, характерное для растений, позволяет предполагать наличие обширного белкового инструментария для «работы» с олиго- и полисахаридами. Помимо ферментов, которые проявляют каталитическую активность по отношению к таким субстратам, существуют еще углевод-связывающие белки, которые не модифицируют углеводы энзиматическим образом, а осуществляют другие функции. У животных одним из классов углевод-связывающих белков служат антитела, которые у растений отсутствуют ввиду иного типа устройства иммунной системы. При этом у растений широко распространены лектины и отдельно обозначаемые белки с углевод-связывающими модулями (СВМ, от carbohydrate-binding modules). Их классификация довольно запутана; примерами первых служат различные агглютинины, а вторых – широко известные экспансины. Для углевод-связывающих белков растений характерно модульное строение с различными комбинациями отдельных доменов и различной их локализацией в общей структуре молекулы. Белки с лектиновыми доменами – наименее изученная группа углевод-связывающих белков растений. Общее число генов таких белков в растительных геномах составляет несколько сотен. Некоторые лектины растений, например, конканавалин А и рицин, широко используются в прикладном плане, при этом биологические функции и механизмы действия лектинов в самом растении изучены слабо. Шире других известна защитная функция лектинов, связанная с распознаванием углеводных мотивов различных патогенов, но большинство генов лектинов экспрессируется и в отсутствии инфицирующих организмов. Лимитирующим звеном в понимании функций растительных лектинов служит слабая характеристика углеводной специфичности большинства представителей. В докладе будут представлены современные сведения о функциональной нагрузке углевод-связывающих белков растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №20-64-47036.

## **Естественные антигликановые антитела избирательно активируют систему комплемента**

*Липатников А.Д.<sup>1</sup>, Обухова П.С.<sup>1,2</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>, Хайдуков С.В.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Российская Федерация*

*<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Российская Федерация*

*E-mail: [alex.9508@yandex.ru](mailto:alex.9508@yandex.ru)*

Антигликановые антитела (АГАТ) являются частью пула естественных антител и способны элиминировать патологически измененные клетки. Предполагается несколько механизмов их цитотоксического действия, однако конкретные результаты получены только для единичных антител, в то время как общее количество АГАТ может достигать нескольких сотен. Цель данной работы - изучение роли антител к опухоль-ассоциированным сахаридам LeC (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) и Tn (GalNAc $\alpha$ ), а также к аминокислотному производному лактозы Lac-AA (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ -Gly-Leu) в активации комплемент-зависимой цитотоксичности.

АГАТ выделяли методом аффинной хроматографии из комплексного иммунного препарата и определяли соотношение IgG/IgM. Способность антител привлекать комплемент изучали разработанным для этих целей колориметрическим методом, основанным на использовании кодецитов - эритроцитов, модифицированных соответствующими синтетическими гликолипидами. Кодециты последовательно инкубировали с исследуемыми антителами и аутологичной сывороткой в качестве источника комплемента, оценивая цитотоксический эффект по интенсивности поглощения гемоглобина, высвобождаемого при гемолизе.

Обнаружено, что анти-LeC и анти-Tn антитела вызывали гемолиз только LeC и Tn кодецитов соответственно, тогда как в контрольных образцах (с немодифицированными эритроцитами; с сывороткой, в которой комплемент блокирован ЭДТА), а также с контрольными кодецитами он практически отсутствовал. В случае с анти-Lac-AA антител гемолиз не наблюдали, даже при их повышенной концентрации, при этом факт их связывания с соответствующими кодецитами был подтвержден цитофлуориметрией. Т.о., не все АГАТ, связавшиеся с антигеном, способны вызывать комплемент-опосредованную цитотоксичность.

Данная работа поддержана грантом РФФИ №18-04-00749

## Адсорбция бычьего сывороточного альбумина на пектиновых гидрогелевых частицах

Мелехин А.К.

ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: [melekhin.anatoliy@yandex.ru](mailto:melekhin.anatoliy@yandex.ru)

Гидрогелевые частицы получали из 2%-ных водных растворов пектинов борщевика Сосновского (HS-1 и HS-2) [1], пектинов каллусных культур ряски малой (LM) и смолевки обыкновенной (SVC), а также из коммерческого яблочного пектина (AP) методом ионотропного гелеобразования [2]. Для определения сорбирующей способности полученные частицы погружали в раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), варьируя pH и температуру раствора, соотношение пектин/белок и время инкубации.

Установлено, что сорбция БСА составляет  $51\pm 4$ ,  $12\pm 5$ ,  $14\pm 6$ ,  $4\pm 1$  и  $35\pm 4$  мг/г на частицах, полученных из HS-1, HS-2, LM, SVC и AP, соответственно, при pH 5.0,  $t = 25^\circ\text{C}$  и времени инкубации 24 часа. Сорбционная способность пектиновых частиц снижается при pH 7.0 и увеличивается при pH 3.0. Обнаружено, что сорбция БСА на частицах составляет 18-24, 42-46 и 16-20 % от наибольшего значения через 1, 3, 6 часов инкубации соответственно. Скорость сорбции увеличивается на 20% при увеличении температуры инкубации до  $37^\circ\text{C}$  в течении 6 часов.

Таким образом, выявлена разница в способности сорбировать белок гидрогелевыми частицами, полученными из пектинов с различными химическими характеристиками. Показано, что сорбция белка на пектиновых гидрогелях увеличивается при снижении pH.

### Список литературы:

1. Patova O. A., Golovchenko V.V., Vityazev F.V. et al. Physicochemical and rheological properties of gelling pectin from Sosnowskyi's hogweed (*Heracleum sosnowskyi*) obtained using different pretreatment conditions. Food Hydrocolloids. 2017. Vol.65 – P. 77-86.

DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.10.042

2. Гюнтер Е.А., Попейко О.В., Истомина Е.И. Получение и свойства гидрогелевых матриц на основе пектинов каллусных культур. Биотехнология. 2020, Т.36 (3), 63-72.

DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-63-72

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 21-73-20005).

**Гликозилтрансферазы и гликозилгидролазы в ходе роста растяжением корней проростков кукурузы (*Zea mays* L.)**

*Назипова А.Р.*<sup>1</sup>, *Козлова Л.В.*<sup>1</sup>, *Горшков О.В.*<sup>1</sup>, *Петрова А.А.*<sup>1</sup>, *Энейская Е.В.*<sup>2</sup>,  
*Кульминская А.А.*<sup>2</sup>, *Горшкова Т.А.*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», г.Казань, Россия*

<sup>2</sup>*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г.Гатчина, Россия*

*E-mail: nazipova\_alsu@mail.ru*

Прикрепленный образ жизни растений требует постоянного доступа к источникам света, минеральных веществ и воды, что требует способности к быстрому росту. Этот процесс обеспечивается необратимым и многократным увеличением размеров клеток растений, называемым ростом растяжением. Поскольку все растительные клетки окружены клеточными стенками углеводной природы, то растяжение подразумевает реорганизацию полисахаридов, сопровождающуюся одновременным встраиванием дополнительного «строительного» материала, что позволяет клетке растягиваться, не теряя прежней толщины клеточной стенки.

Механизмы, обеспечивающие этот процесс, изучены в основном, у двудольных, в то время как у злаков, обладающих клеточными стенками другого состава, механизмы роста растяжением менее исследованы. Активное участие в этом процессе могут принимать гликозилтрансферазы и гликозилгидролазы, участвующие в синтезе и распаде полисахаридов, соответственно.

Кончик корня проростка кукурузы использовался нами в качестве объекта исследования, поскольку в нем легко разграничить зону деления, и зоны инициации и завершения роста растяжением клеток. Профили экспрессии генов, кодирующих гликозилтрансферазы и гликозилгидролазы, были сопоставлены с результатами иммуногистохимического детектирования различных полисахаридов клеточных стенок и анализа динамик гликангидролазной активности вдоль кончика корня. Было обнаружено, что на стадии запуска процесса роста растяжением клеточные стенки злаков совмещают в себе особенности клеточных стенок как злаков, так и двудольных растений, но уже на стадии активного роста, синтез компонентов клеточных стенок злаков значительно превалирует в кукурузе. Кроме этого, были выявлены два отдельных набора генов, кодирующих гликозилтрансферазы и гликозилгидролазы, предположительно участвующие в синтезе и модификации двух разных популяций глюкуроноарабиноксилана.

Работа выполняется при финансовой поддержке Российского научного фонда, № проекта 18-14-00168.

## Транскриптомный анализ участия лектиновых киназ растений льна в процессах формирования клеточной стенки

*Петрова Н.В., Горшкова Т.А.*

*КИББ - обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия*

*E-mail: [npetrova@inbox.ru](mailto:npetrova@inbox.ru)*

Многообразие углеводных мотивов, создаваемое для функционирования такого сложного и объемного компартмента растительной клетки как клеточная стенка, предполагает существование не менее сложных систем их распознавания и контроля. В качестве одной из систем мониторинга выступают киназы с лектиновыми доменами – химерные белки, с одной стороны имеющие домен, воспринимающий структуру углевода, а с другой стороны – домен, осуществляющий фосфорилирование белков [1]. Фосфорилирование – один из наиболее распространенных типов посттрансляционной модификации белков, регулируемый парой киназа/фосфатаза. Процессы обратимого фосфорилирования, влияющие на функциональную активность белков-мишеней, важная часть внутриклеточного сигналинга. Изменения структуры клеточной стенки, воспринимаемые углевод-связывающим лектиновым доменом, через реакции фосфорилирования обуславливают ответные реакции растительной клетки. Лектиновые домены способны избирательно и обратимо связываться с моно- и олигосахаридами, при этом не имеют в своей последовательности участков, ферментативно взаимодействующих с распознаваемым углеводом, что является их ключевой особенностью.

Нами проведен анализ генома льна на наличие генов белков с архитектурой лектиновой рецептор-подобной киназы и оценен уровень экспрессии этих белков в тканях стебля, различающихся по типу клеточной стенки. Поиск белков с лектиновыми доменами в геноме проводили, ориентируясь на последовательности, представленные в базе Pfam и описанные в литературе [2, 3]. Было выявлено 406 последовательностей, более половины которых кодируют белки, имеющие помимо лектинового, киназный домен. Наиболее многочисленные группы киназы образуют внутри семейств лектинов с Legume, GNA-, LysM, Malectin и Malectin-like доменами. Транскриптомный анализ выявил паттерны активации киназ с лектиновыми доменами разной углеводной специфичности, сопряженные с формированием различных типов клеточной стенки растений.

Работа поддержана грантом РФФ 20-64-47036.

### *Список литературы:*

1. *Bellande K., Bono J. J., Savelli B., Jamet E., Canut, H.* Plant lectins and lectin receptor-like kinases: how do they sense the outside? *International Journal of Molecular Sciences* (2017). DOI 10.3390/ijms18061164.
2. *Van Damme E. J. M., Lannoo N., Peumans W. J.* Plant lectins. *Advances in botanical research* (2008). DOI 10.1016/S0065-2296(08)00403-5.
3. *Jiang S. Y., Ma Z., Ramachandran S.* Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC evolutionary biology* (2010). DOI 10.1186/1471-2148-10-79.

## Синтез и свойства гетерогенных гликоальбуминов, содержащих фрагменты двух или четырех различных *N*-гликанов

Смирнов И.С.<sup>1</sup>, Замалиева Р.Р.<sup>1</sup>, Курбангалиева А.Р.<sup>1</sup>, Танака К.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Кластер новаторских исследований RIKEN, Вако, Япония

<sup>3</sup>Токийский технологический институт, Токио, Япония

E-mail: IvSSmirnov@kpfu.ru

*N*-гликаны и их конъюгаты с белками или жирами играют важную роль в таких биологических процессах, как адгезия клеток, межклеточное распознавание, модулирование иммунного ответа и др. Ранее в нашей группе был разработан метод синтеза гомогенных и гетерогенных гликоконъюгатов на основе *N*-гликанов и человеческого альбумина с целью изучения аспектов механизма распознавания образов *N*-гликанов и поиска селективных взаимодействий с опухолевыми клетками [1]. В данной работе мы задались целью синтезировать и изучить свойства гетерогенных гликоальбуминов, содержащих фрагменты двух или четырех различных *N*-гликанов.

Синтез гетерогенных кластеров основан на первоначальном введении фрагментов двух различных *N*-гликанов в структуру азидсодержащего линкера и последующей иммобилизации *N*-гликаназидов на флуоресцентно-меченый альбумин с помощью стратегии двух последовательных клик-реакций. Исследование эффективности распознавания различных линий раковых клеток *in vitro* полученными гетерогенными гликоконъюгатами, несущими остатки двух гликанов, позволило выявить два гликокластера-лидера, на основе которых впервые синтезированы гликоальбумины с более высокой степенью гетерогенности, содержащие фрагменты четырех различных *N*-гликанов [2]. Последние были вовлечены в цикл биологических исследований по оценке селективности их взаимодействия с различными линиями раковых клеток в экспериментах *in vitro*, а в отношении клеток SW620 проведена флуоресцентная визуализация *ex vivo* и *in vivo* в организмах модельных мышей.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности № 0671-2020-0063

### Список литературы:

1. Latypova L., Sibgatullina R., Ogura A., Fujiki K., Khabibrakhmanova A., Tahara T., Nozaki S., Urano S., Tsubokura K., Onoe H., Watanabe Y., Kurbangaliev A., Tanaka K. Sequential double “clicks” toward structurally well-defined heterogeneous *N*-glycoclusters: the importance of cluster heterogeneity on pattern recognition *in vivo*. *Advanced Science* (2017). DOI: 10.1002/advs.201600394.
2. Smirnov I., Sibgatullina R., Urano S., Tahara T., Ahmadi P., Watanabe Y., Pradipta A.R., Kurbangaliev A., Tanaka K. A strategy for tumor targeting by higher-order glycan pattern recognition: synthesis and *in vitro* and *in vivo* properties of glycoalbumins conjugated with four different *N*-glycan molecules. *Small* (2020). DOI: 10.1002/sml.202004831.

## Репертуар антигликановых антител при нормальной и осложненной беременности

*Терентьева А.В.<sup>1</sup>, Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Хасбиуллина Н.Р.<sup>1</sup>, Нокель А.Ю.<sup>1,2</sup>, Бовин Н.В.<sup>2</sup>,  
Зиганшина М.М.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Минздрава России,

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской Академии Наук

**Актуальность.** Для резидентных антигликановых антител (АГАТ), обнаруживаемых в плаценте, предполагаются антиген-блокирующие свойства, то есть, их связывание с аллогенными антигенами плода защищает фетальные клетки от атаки иммунной системы матери. Если это предположение верно, то недостаток таких антител будет приводить к развитию больших акушерских синдромов, связанных с патологией плацентации, в частности, преэклампсии (ПЭ), а их изучение поможет в диагностике и возможно, иммунотерапии названных заболеваний.

Целью исследования являлась характеристика репертуара АГАТ в элюатах плаценты при нормальной и осложненной ПЭ беременности.

**Материалы и методы.** В исследование были включены пациентки с нормальной беременностью (n=15) и осложненной ПЭ (n=14). Материалом являлась ткань плаценты и сыворотка крови матери. Антитела с плаценты были получены методом последовательной элюции кислым (0,2М глицин-HCl+0,01% NaN<sub>3</sub>, pH=2.8) и затем щелочным (0,2М трис/0.5М NaCl+0,01% NaN<sub>3</sub>, pH=10.6) буферными растворами. АГАТ определяли с помощью гликочипов (ООО «Семиотик»), содержащих 400 гликанов. Для оценки межгрупповых различий был использован U-критерий Манна-Уитни (p<0.01).

**Результаты.** Установлено: 1) репертуар АГАТ в элюатах плаценты значительно уже, чем в крови матери в обеих группах исследования, что особенно выражено при ПЭ; 2) частота выявления антител некоторых специфичностей (к Neu5Ac $\beta$ , LeA, TF, Tn) в элюатах плаценты здоровых беременных значительно выше, чем в крови; 3) при ПЭ уровень АГАТ к Fs, LeA, хитопентаозе и антигену Tn в элюатах плаценты значимо снижен по сравнению с нормальной беременностью.

**Заключение.** Присутствие в плаценте АГАТ определенных специфичностей при нормальной беременности может свидетельствовать об их протективной роли. Однако нельзя исключить и изменение структуры гликанов гликокаликса плаценты, как причину изменения репертуара АГАТ при патологиях.

Работа поддержана грантом РФФИ N19-015-00102.

## **Ферментные системы для получения редких сахаров**

*Швецова С. В.<sup>1,2</sup>, Кульминская А. А.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г.Гатчина*

*<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург*

*E-mail: shvetsova\_sv@npri.nrcki.ru*

Редкие сахара, такие как *D*- и *L*-тагатоза, стали новыми кандидатами для замены обычных сахаров в качестве функционального подсластителя, а также для некоторых областей фармацевтики и медицины. *D*-тагатоза представляет собой кето-гексозу, эпимер *D*-фруктозы, химическая структура которого отличается от структуры *D*-фруктозы положением гидроксильной группы при четвертом углероде. *D*-тагатоза чуть более десяти лет назад была одобрена Европейским Союзом в качестве нового пищевого ингредиента без ограничений для его использования. Но для легкого получения в больших масштабах имеются ограничения по способу ее получения. В отличие от *D*-тагатозы, технологически высокоценимого редкого сахара, ее энантиомер, *L*-тагатоза, исследована еще недостаточно широко и не используется в коммерческих масштабах. Несмотря на это, *L*-тагатоза – многообещающий строительный блок для производства многих соединений (синтонов) с добавленной стоимостью.

Известны традиционные химические способы получения редких сахаров, но они не всегда применимы ввиду ряда ограничивающих факторов. Ферментативные биотрансформации различных функциональных моносахаридов - новое направление углеводной биотехнологии. Для получения редких сахаров часто рассматривают пути использования, совершенствования и оптимизации разнообразных ферментных систем. Теоретически все редкие сахара могут быть получены из дешевых натуральных углеводов, встречающихся в природе в большом количестве (*D*-фруктоза, *D*-глюкоза, *D*-галактоза) в результате действия различных ферментативных систем. Так, например, синергетическое действие трех ключевых типов ферментов, - эпимеразы, изомеразы и оксидоредуктазы делает возможным преобразование доступных углеводов до *D/L*-тагатозы («стратегия Изумори»). Перспективной альтернативой «стратегии Изумори» для получения тагатозы является присоединение альдолов, катализируемые альдолазами, иными словами, синтез путем соединения двух малых фрагментов. Открытие новых функций некоторых белков дает возможность разработки новых катаболических путей для получения *D*- и *L*-тагатозы, как, например, использование ферментов трансминазы и трансальдолазы.

В докладе обобщены и представлены последние инновационные разработки по поиску и использованию ферментов, а также оптимизации процессов для синтеза *D*- и *L*-тагатозы; рассмотрены структурные особенности основных ферментов, используемых в биосинтезе редких сахаров, варианты молекулярных модификаций биокатализаторов и перспективы практического использования каждого из обсуждаемых в работе ферментных путей. Мы рассмотрим конкретные детали, касающиеся различных биологических стратегий производства *D*- и *L*-тагатозы в результате микробной биотрансформации и ферментативного катализа.

## СЕКЦИЯ «Гликоинформатика и омиксные технологии»

### Использование методов машинного обучения как инструмента для предсказания субстратной специфичности углеводов-связывающих белков

*Антонова М.И., Макшакова О.Н.*

*Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН,  
Казань, Россия*

*E-mail: m.antonova@kibb.knc.ru*

Гликозаминогликаны - отрицательно заряженные, неразветвленные полисахариды, являются важным компонентом межклеточного матрикса. Будучи частью гликопротеинов, они отвечают за взаимодействие с межклеточными белками хозяина, выполняя сигнальные функции, а также участвуют в распознавании вирусных и бактериальных патогенов млекопитающих. Помимо этого, они определяют развитие и морфологию клеток в норме и патологии. Широкий диапазон функций гликозаминогликанов в организме свидетельствует о важности изучения молекулярных основ распознавания белками данных типов полисахаридов. Однако, получение экспериментальной информации о взаимодействии *in vitro* ограничено сложностями в синтезе целевых белков и лигандов, о чем свидетельствует относительно небольшое содержание структурной информации в базе данных трехмерных структур GAG-DB [1]. Методы биоинформатики и *in silico* дизайна могут значительно облегчить проводимые исследования, предлагая широкое разнообразие новых подходов и компьютерных моделей для определения субстратной специфичности.

В данном докладе будут рассмотрены подходы машинного обучения к созданию компьютерных моделей для предсказания субстратной специфичности по отношению к гликозаминогликанам. Оценка эффективности модели на примере гепарина показала сбалансированную точность равную 0.93. Верификация результатов работы модели была проведена на известных комплексах с гепарином из базы данных GAG-DB.

Авторы благодарны РФФИ за частичную финансовую поддержку в рамках научного проекта № 21-54-15008 НЦНИ\_а.

#### *Список литературы:*

1. *Perez S., Bonnardel F., Lisacek F., Imberty A., Blum S.R., Makshakova O.N.* GAG-DB, the New Interface of the Three-Dimensional Landscape of Glycosaminoglycans. *Biomolecules* (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10121660>

**Многомасштабное компьютерное моделирование - инструмент для исследования сложных углеводов и гликоконъюгатов в широком пространственно-временном диапазоне**

*Макшакова О.Н.<sup>1</sup>, Perez S.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия*

<sup>2</sup> *CNRS, Centre de Recherches sur les Macromolécules Vegetales, University Grenoble Alpes, Grenoble, France*

*E-mail: [olga.makshakova@kibb.knc.ru](mailto:olga.makshakova@kibb.knc.ru)*

Многие аспекты биологических процессов характеризуются большими пространственными и/или временными масштабами. В частности, функции и свойства сложных углеводов и их конъюгатов охватывают несколько порядков величин. Возможность охватить широкий диапазон через компьютерное моделирование требует интеграции новых инструментов. Благодаря развитию высокопроизводительных вычислений становятся доступными новые подходы моделирования в широком диапазоне масштабов. В рамках данных подходов набор методов описывает молекулярную систему на разных уровнях (в нано-, микро- и мезомасштабе). Таким образом «компьютерная микроскопия» обеспечивает варьлируемое разрешение и позволяет восполнить пробелы в экспериментальных данных и способствует дизайну новых экспериментов [1].

В данном докладе речь пойдет об использовании методов молекулярной динамики на двух уровнях представления молекулярной системы. Полноатомные (All-Atom) и укрупненные (Coarse-Grained) модели и объединены внутренней логикой описания молекулярной системы. Это позволяет покрыть широкий пространственно-временной диапазон, не теряя информации об атомарном строении вещества. Будут рассмотрены принципы описания молекулярной системы в рамках данных подходов, а также даны примеры исследования сложных углеводов и гликоконъюгатов. В частности, будут представлены результаты моделирования взаимодействий разветвленных полисахаридов [2] и процессов сборки активных комплексов белков с гликолипидами на поверхности мембраны [3, 4].

Авторы благодарны за предоставление доступа к центру коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия) и Университета Гренобль-Альпы (Гренобль, Франция), а также РФФИ и Национальному центру научных исследований Франции за частичную финансовую поддержку в рамках научного проекта № 21-54-15008 НЦНИ\_a, а также программе Glyco@Alps для научного обмена.

*Список литературы:*

1. *Perez S., Fadda E., Makshakova O.* Molecular modeling in glycoscience. in Comprehensive Glycoscience edited 2d Ed. (2021) DOI 10.1016/B978-0-12-819475-1.00004-3.
2. *Makshakova O.N., Gorshkova T.A., Mikshina P.V., Zuev Y.F., Perez S.* Metrics of rhamnogalacturonan I with  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked galactan side chains and structural basis for its self-aggregation. Carbohydrate Polymers (2017). DOI 10.1016/j.carbopol.2016.11.082.
3. *Makshakova O., Breton C., Perez S.* Unraveling the complex enzymatic machinery making a key galactolipid in chloroplast membrane: a multiscale computer simulation. Scientific Reports (2020). DOI 10.1038/s41598-020-70425-z.

4. *Kociurzynski R., Makshakova O., Knecht V., Römer W.* Multiscale Molecular Dynamics Studies Reveal Different Modes of Receptor Clustering by Gb3-Binding Lectins. *Journal of Chemical Theory and Computation* (2021). DOI 10.1021/acs.jctc.0c01145.

## **Общедоступные компьютерные инструменты гликобиологии (обзор)**

*Тоукач Ф.В.*

*ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия*

*E-mail: netbox@toukach.ru*

Представлен обзор современных компьютерных инструментов гликобиологии, доступных пользователям через Интернет. По сравнению с другими "-омиками", именно в гликомике за последние десять лет произошел ярко выраженный рывок в сторону использования компьютерных технологий. Появились не только прикладные программы и веб-сервисы для решения конкретных задач, но и теоретическое обоснование гликоинформатики, единая систематизация, автоматическая связь между разными сервисами и другие признаки развитого информационного обеспечения целой области знания. Многие разработанные технологии уже доступны не только специалистам-информатикам, но и химикам и биологам без специальной ИТ-подготовки. В докладе будет представлена сводная информация об углеводно-структурных, гликоферментных и прочих базах данных, репозиториях уникальных идентификаторов углеводов, различных языках описания углеводов и трансляторах между ними, визуальных редакторах химической структуры, ориентированных на углеводы, способах визуализации структур, помощниках в интерпретации инструментальных исследований углеводных образцов, моделерах и визуализаторах пространственной структуры биогликанов и их фрагментов.

Подготовка обзора поддержана грантом РФФИ 18-14-00098П. Подробная аннотация, иллюстративные материалы и литературные ссылки доступны на веб-странице лекции по адресу <http://toukach.ru/rus/glyco-db.htm>

**Поиск участков белков, перспективных для внесения аминокислотных замен с целью улучшения свойств углеводов-модифицирующих ферментов методами компьютерного моделирования.**

Швецов А.В.<sup>1,2,3</sup>, Шмидт А.Е.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

E-mail: shvetsov\_av@pnpi.nrcki.ru

В настоящее время довольно часто требуется получить важный для биотехнологических процессов фермент с изменёнными свойствами, например субстратной специфичностью или термостабильностью. В таком случае актуальной темой становится разработка методов, позволяющих определить наиболее чувствительные участки для внесения аминокислотных замен с целью направленной модификации свойств фермента.

В представляемой работе будет рассмотрена методология поиска перспективных участков ферментов, внесение изменений в которые будет приводить к увеличению термостабильности исследуемого фермента. Предлагаемая методология основана на применении методов компьютерного моделирования и молекулярной динамики с последующим анализом полученных данных. Работоспособность данного подхода продемонстрирована [1] на примере глюкоамилазы из *A. awamori*.

*Список литературы:*

1. Schmidt, A., Shvetsov, A., Soboleva, E., Kil, Y., Sergeev, V., & Surzhik, M. (2019). *Thermostability improvement of Aspergillus awamori glucoamylase via directed evolution of its gene located on episomal expression vector in Pichia pastoris cells. Protein Engineering, Design and Selection, 652164. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz048>*

## СЕКЦИЯ «Гликобиология: путь к востребованному продукту»

### 40 лет полиакриламидных гликоконъюгатов

Н.В.Бовин

Институт Биоорганической химии РАН, Москва

Полиакриламидные конъюгаты гликанов уже давно широко используются во многих областях гликобиологии, главным образом для иммобилизации гликанов в твердофазных анализах и в качестве поливалентных ингибиторов гликан-белковых взаимодействий [1,2]. Биотиновая метка в составе полимерной цепи позволяет количественно иммобилизовать Gluc-РАА на любой поверхности, а также действует как трейсер для обнаружения углеводсвязывающих белков. Однако объем уже реализованных возможностей этих зондов неизмеримо богаче, чем перечисленные выше. Этот обзорный доклад кратко коснется рутинных применений, которые широко опубликованы, и сфокусируется на менее распространенных, но не менее значимых областях применения РАА-связанных гликанов [3]. Также, в нем будут представлены данные о самих гликополимерах, их молекулярной массе, размере и гибкости полимерной цепи, - что важно знать при гликобиологических применениях РАА-гликопроб, а также о методах синтеза, о кластеризации гликанов в составе полимера и об энтропийном факторе взаимодействия гибких гликопроб с углеводсвязывающими белками.

#### Список литературы:

1. N.V. Bovin, E.Yu. Korchagina, T.V.Zemlyanukhina, N.E.Byramova, O.E.Galanina, A.E.Zemlyakov, A.E.Ivanov, V.P.Zubov, L.V.Mochalova. Synthesis of polymeric neoglycoconjugates based on N-substituted polyacrylamide. *Glycoconj. J.*, **10**, 142-151 (1993).
2. N.V. Bovin. Polyacrylamide-based glycoconjugates as tools for studying lectins, antibodies, and glycosyltransferases in glycobiology, cytochemistry, and histochemistry. *Russ. J. Bioorgan. Chem.*, **22**, 547-566 (1996).
3. Tuzikov A, Chinarev A, Shilova N, Gordeeva E, Galanina O, Ovchinnikova T, Schaefer M, Bovin N. 40 years of glyco-polyacrylamide in glycobiology. *Glycoconj J.* 2021 Jan 14, **38**, 89-100. doi: 10.1007/s10719-020-09965-5.

## Офтальмологические системы доставки дексаметазона на основе хитозана

Бокатый А.Н.<sup>1,2</sup>, Дубашинская Н.В.<sup>1</sup>, Скорик Ю.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: [gwezakura@yandex.ru](mailto:gwezakura@yandex.ru)

Интравитреальная инъекция является одним из наиболее эффективных способов доставки лекарственных средств в задний сегмент глаза и лечения офтальмологических заболеваний, однако при длительном применении инъекции могут приводить к отслоению сетчатки и снижению эффективности терапии [1]. Поэтому требуются интравитреальные системы доставки, которые будут обладать пролонгированным действием, при этом поддерживая терапевтические концентрации в течение длительного времени [2]. Использование полимерных конъюгатов для интравитреальной доставки (например, кортикостероида дексаметазона, Декс) имеет большой потенциал, однако до сих пор этот подход используется крайне редко [3].

Цель исследования – разработка способа конъюгирования Декс с хитозаном (ХЗ) для возможного использования в качестве интравитреальной системы доставки Декс. В рамках поставленной цели задачами исследования были: (i) получение и характеристика сукцинилдексаметазона (Сук-Декс), (ii) разработка методики синтеза и характеристика конъюгатов Сук-Декс-ХЗ, (iii) сукцинирование Сук-Декс-ХЗ для формирования отрицательно заряженных частиц (Сук-Декс-ХЗ-Сук), (iv) изучение физико-химических характеристик конъюгатов (гидродинамический диаметр и  $\zeta$ -потенциал) и кинетики высвобождения Декс.

Сук-Декс был получен взаимодействием Декс и янтарного ангидрида в среде пиридина. Сук-Декс-ХЗ получали методом карбодиимидной активации реакцией хитозана и Сук-Декс в присутствии N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида и N-гидроксисукцинимидом при различных мольных соотношениях реагентов, в результате чего были получены 4 конъюгата со степенью замещения от 2 до 4%, которые в дальнейшем сукцинировали янтарным ангидридом. Все синтезированные конъюгаты охарактеризованы методами элементного анализа, ИК и ЯМР спектроскопии. Наличие гидрофобного фрагмента (Декс) и гидрофильных групп (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH) в конъюгатах приводит к образованию в водной среде самособирающихся частиц субмикронного размера (400 – 1100 нм).  $\zeta$ -Потенциал Сук-Декс-ХЗ составил +(13–23) мВ, тогда как для Сук-Декс-ХЗ-Сук –(27–32) мВ. Изучение кинетики высвобождения показало, что конъюгаты пролонгировано высвобождают как Декс, так и Сук-Декс суммарно в количестве 8–10% в течение 30 дней, это хороший результат, так как это означает, что количество инъекций можно сократить, например, до 1 раза в месяц.

### Список литературы:

1. Cox, J.T.; Elliott, D.; Sobrin, L. Inflammatory complications of intravitreal anti-vegf injections. *Journal of Clinical Medicine* **2021**, *10*, 981, DOI:10.3390/jcm10050981
2. Bhattacharya, M.; Sadeghi, A.; Sarkhel, S.; Hagström, M.; Bahrpeyma, S.; Toropainen, E.; Auriola, S.; Urtti, A. Release of functional dexamethasone by intracellular enzymes: A modular peptide-based strategy for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2020**, *327*, 584–594, DOI:10.1016/j.jconrel.2020.09.005

3. Dubashynskaya, N.V.; Bokaty, A.N.; Skorik, Y.A. Dexamethasone conjugates: Synthetic approaches and medical prospects. *Biomedicines* 2021, 9, 341, DOI:10.3390/biomedicines9040341

**Получение гелей на основе пектина, выделенного из борщевика Сосновского  
*Heracleum sosnowskyi* Manden**

***Витязев Ф.В.<sup>1</sup>, Попов С.В.<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>*Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар*

*E-mail: [rodefex@mail.ru](mailto:rodefex@mail.ru)*

Пектины составляют одну из наиболее распространенных групп растительных полисахаридов [1]. Гелеобразующая способность пектинов и их физиологическая активность определяет их широкое применение в пищевой промышленности, где они используются в качестве стабилизаторов, загустителей и гелеобразователей. Поэтому актуален поиск сырья для получения пектинов, отличающихся разнообразием структуры и свойствами. В данной работе была изучена гелеобразующая способность пектиновых полисахаридов, выделенного из борщевика Сосновского HS [3], и коммерческого яблочного пектина AU701 (Herbstreith & Fox, Германия). Гели получали из 1%, 2% и 4% растворов пектинов методом инотропного желирования в присутствии ионов кальция. В качестве источников ионов кальция использовали хлорид и глюконат кальция. Показано, что прочность гелей увеличивается с повышением концентрации пектина, использованного при получении гелей. Установлено, что прочность гелей на основе пектина HS выше, чем у гелей на основе пектина AU701. Выявлено, что степень набухания высушенных гелей в воде выше у гелей, при получении которых был использован глюконат кальция, а также зависит от концентрации пектина, использованного для получения гелей. Определено, что гели, полученные из пектина HS, характеризуются большей устойчивостью в средах с pH=1.2 и 6.8 по сравнению с гелями, полученными на основе коммерческого пектина AU701. Определено, что степень загрузки глюкозы в пектиновых гелях составляет 8-14%. Установлено, что в первый час инкубации из гелей в средах с pH=1.2 и 6.8 высвобождается 40-60% глюкозы. Высвобождение глюкозы из гелей не зависит от концентрации пектина, использованного для получения гелей.

*Список литературы:*

1. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия (1998), Т. 24. С. 483-501.
2. Patova O.A., Golovchenko V.V., Vityazev F.V., Burkov A.A., Belyi V.A., Kuznetsov S.N., Litvinets S.G., Martinson E.A. Physicochemical and rheological properties of gelling pectin from Sosnowskyi's hogweed (*Heracleum sosnowskyi*) obtained using different pretreatment conditions. Food Hydrocolloids (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.042>

## Системы доставки колистина на основе полисахаридов

*Дубашинская Н.В.<sup>1</sup>, Бокатый А.Н.<sup>1,2</sup>, Скорик Ю.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация*

*E-mail: dubashinskaya@gmail.com*

Колистин представляет собой высокоэффективный полипептидный антимикробный препарат против грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Однако колистин имеет низкую абсорбцию при пероральном приеме, а также высокую нефро- и нейротоксичность. Разработка наноразмерных систем доставки лекарственных средств в виде полимерных конъюгатов является привлекательным способом улучшить терапевтические свойства антимикробных агентов (снижение дозы и токсичности) [1]. Целью данной работы была разработка систем адресной доставки колистина на основе полисахаридов для потенциального применения в качестве наноантибиотика.

Предлагаемые системы доставки были получены карбодиимидным методом реакцией колистина с гиалуроновой кислотой (молекулярная масса 185000) или сукцинил-хитозаном со степенью сукцинирования 58% (синтезирован из хитозана с молекулярной массой 37000 и степенью дезацетилирования 74% по методике [2]). В результате были получены конъюгаты с различными степенями замещения (3–12%), которые самособирались в водных средах в наноструктуры с гидродинамическим диаметром 100–400 нм и ζ-потенциалом -(22–33) мВ; содержание колистина составляло от 130 до 380 мкг/мг. Изучение кинетики высвобождения показало, что в течение 24 ч колистин практически не высвобождался из конъюгатов (1-3% высвобождалось в среду с рН 7,4 и 2,5-5% – в среду с рН 5,2). При этом минимальные ингибирующие концентрации конъюгатов с высокими степенями замещения (8-12%) по отношению к *P. aeruginosa* ( $1 \times 10^7$  КОЕ/мл) не изменились по сравнению с исходным колистином и составили 1 мкг/мл, что свидетельствует о сохранении его антимикробной активности в составе полисахаридного конъюгата. Таким образом, полисахариды являются перспективной платформой для получения наносистем адресной доставки колистина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-20157)

### *Список литературы:*

1. *Dubashynskaya N.V., Skorik Y.A. Polymyxin Delivery Systems: Recent Advances and Challenges. Pharmaceuticals (2020). DOI: 10.3390/ph13050083*
2. *Skorik Y.A., Kritchenkov A.S., Moskalenko Y.E., Golyshev A.A., Raik S.V., Whaley A.K., Vasina L.V., Sonin D.L. Synthesis of N-succinyl- and N-glutaryl-chitosan derivatives and their antioxidant, antiplatelet, and anticoagulant activity. Carbohydrate Polymers (2017). DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.02.097*

## Полисахариды в мукоадгезивных лекарственных формах

Ермак И.М.

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

E-mail: [imyer@mail.ru](mailto:imyer@mail.ru)

Мукоадгезивные системы доставки лекарственных средств позволяют в значительной степени увеличить эффективность используемого препарата и характеризуются простотой и удобством применения в виде таблеток, спреев, плёнок через пероральный, буккальный, назальный, трансбуккальный и местные пути введения. Мукоадгезивность таких систем достигается путём создания гидрофильных матриц на основе полимеров, которые обеспечивают хорошую адгезию с муцином.

Приведён анализ литературных и собственных данных по мукоадгезивным свойствам полисахаридов, характере сил их взаимодействия с муцином и дана характеристика физико-химических и механических методов исследования для оценки этого взаимодействия. Показана перспективность использования нетоксичных и биосовместимых полисахаридов морских гидробионтов: хитозана и сульфатированных галактанов красных водорослей–каррагинанов для создания мукоадгезивных лекарственных форм. На основе данных, полученных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, показано, что каррагинаны взаимодействуют с муцином посредством силы адгезии, водородных связей и электростатического взаимодействия, а их мукоадгезивный эффект зависит от структуры полисахарида. Сочетание мукоадгезивных и гелеобразующих свойств каррагинанов с их способностью образовывать комплексы с хитозаном, обеспечивает применение этих полисахаридов в качестве основных компонентов для получения мукоадгезивных средств доставки в виде гелевых гранул, липосом, пленок. Показано влияние структурных особенностей каррагинанов, а также хитозана на формирование гранул, их морфологию, мукоадгезивные свойства и рН зависимое набухание в водных средах, имитирующих ЖКТ и слёзную жидкость. Изучена динамика высвобождения лекарственной субстанции–эхинохром (ЭХ), который с высокой эффективностью включается в полученные липосомы и гранулы, сохраняя стабильность после их лиофилизации. Медленное высвобождение ЭХ наблюдается из матриц, полученных на основе каррагинанов низкой степени сульфатирования, покрытых хитозаном. Мукоадгезивные матрицы на основе каррагинана и хитозана обеспечивают дополнительные преимущества для неинвазивного применения лекарственной субстанции ЭХ, расширяя возможности его использования.

Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-20019.

## Конъюгаты паклитаксела с хитозаном для противоопухолевой терапии

*Зеленцова Е.В.<sup>1,2</sup>, Пошина Д.Н.<sup>1</sup>, Скорик Ю.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup> *Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: [zelencova.ekaterina@pharminnotech.com](mailto:zelencova.ekaterina@pharminnotech.com)*

Химиотерапия, среди прочих методов борьбы с раком, является наиболее эффективным и распространенным средством лечения онкологии. Из множества противораковых агентов стоит обратить внимание на группу таксанов [1]. Паклитаксел наряду с другими таксанами обладает высокой противоопухолевой активностью по отношению к различным типам раковых клеток. Однако из-за существования объективных недостатков, среди которых плохая растворимость и высокая общая токсичность, терапевтические свойства паклитаксела неизбежно снижаются [2]. На данный момент ведутся разработки систем доставки таксанов на основе широкого спектра наночастиц. Одной из очень перспективных молекул-переносчиков является биополимер хитозан, получаемый из хитина панцирей ракообразных [3]. Амфифильные самособирающиеся наночастицы на основе хитозана имеют гидрофобное внутреннее ядро для загрузки плохо растворимых в воде субстанций и гидрофильную оболочку, стабилизирующую наночастицу в водной среде [4].

Целью данной работы является разработка системы внутриопухолевой доставки паклитаксела (РТХ) на основе конъюгатов с хитозаном (CS). Был произведен синтез конъюгата РТХ с CS (молекулярная масса 37000, степень деацетилирования 0,74) через сукцинильный линкер. Образование конъюгата РТХ-CS подтверждено методами ИК-Фурье и <sup>1</sup>Н ЯМР спектроскопии. Степень замещения, определенная спектрофотометрически при длине волны поглощения паклитаксела 230 нм, составила 0,95% (мольн.). Самособирающиеся наночастицы на основе РТХ-CS имели сферическую форму (определено методом атомно-силовой микроскопии), средний гидродинамический радиус около 85 нм и  $\zeta$ -потенциал не менее +29 мВ. Общее кумулятивное высвобождение РТХ за 24 ч при 37 °С в натрий-фосфатном буферном растворе при рН 7,4 достигло 73,9%, а при рН 5,0 – 83,4%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки систем доставки таксанов на основе конъюгатов с хитозаном.

### *Список литературы:*

1. *Feng T., Zhao Y. Clinical anticancer drugs for cancer treatment, in nanomaterial-based drug delivery carriers for cancer therapy. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology (2017). DOI: 10.1007/978-981-10-3299-8\_2*
2. *Bernabeu. E., Cagel M., Lagomarsino E., Moretton M., Chiappetta D. A. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. International Journal of Pharmaceutics (2017). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.016*
3. *Хумаири А.Х., Островский О.В., Зыкова Е.В., Сперанский Д.Л. Адресные системы доставки лекарств в химиотерапии рака молочной железы. Вестник ВолгМГУ (2021). DOI: 10.19163/1994-9480-2021-1(77)-12-16*
4. *Fathi M., Majidi S., Sahandi P., Barar Z. J., Erfan-Niya H., Omidi Y. Chitosan-based multifunctional nanomedicines and theranostics for targeted therapy of cancer. Medicinal Research Reviews (2018). DOI: 10.1002/med.21506*

**Фукозилированные гликаны бактерий как паттерны формирования иммунной толерантности на экспериментальной модели Воспалительных заболеваний кишечника.**

*Литвинова Е.А.<sup>1,2</sup>, Блинова Е.А.<sup>1,3</sup>, Феофанова Н.А.<sup>1,3</sup>, Барковская М.Ш.<sup>1,3</sup>,  
Калмыкова Г.В.<sup>1,2</sup>, Акулова Н.И.<sup>1,2</sup>, Аржанова Е.Л.<sup>1</sup>, Бец В.Д.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», Новосибирск, РФ

<sup>2</sup>Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Краснообск, РФ

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Новосибирск, РФ

E-mail: [litvinovaea@physiol.ru](mailto:litvinovaea@physiol.ru)

Распознавание бактерий по поверхностным гликанам происходит иммунными клетками. Отсутствие фукозилированных гликанов на поверхности бактерий может вызывать воспалительный ответ при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) [1]. *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.* и *E.coli* могут иметь на поверхности гликаны, в состав которых входит фукоза. Фукоза, в составе гликанов, может активировать дендритные клетки через рецептор DC-SIGN [2]. Зрелые дендритные клетки могут активировать Т-клетки и запускать Т-регуляторный ответ. На экспериментальной модели ВЗК, мышах *Muc2<sup>-/-</sup>*, показано, что в ткани толстой кишки развивается хроническое воспаление. Переключение воспалительной реакции на регуляторный противовоспалительный процесс должно помочь облегчить состояние при ВЗК. Цель данного исследования - определить будут ли фукозилированные гликаны бактерий, выделенных из кишечника мышей с патологией и без, запускать процессы в дендритных клетках (ДК) животных, которые переключат Т-клетки по регуляторному пути *in vitro*.

Методы: Исследование выполнено на ДК, сгенерированных из костного мозга *Muc2<sup>-/-</sup>* мышей модель ВЗК и контрольных мышей C57BL/6. Определение фенотипа ДК до и после обработкой L-фукозой и бактериями, в клеточных стенках которых была фукоза, проводили с помощью проточного цитометра FACSCantoII и антител I-Ab, CD80, CD86, CD209, CD11c (BioLegend). Выделение бактерий из кишечных контентов выполняли на дифференцировочных средах с последующей идентификацией методом секвенирования гена *16S* рРНК. На поверхности бактерий определяли фукозилированные гликаны с помощью UEA I меченного FITC.

Результаты: L-фукоза не оказывала эффекта на фенотип дендритных клеток. Однако, L-фукоза сама и на поверхности бактерий влияли на представленность DC-SIGN. DC-SIGN может влиять на активность ДК через TLR рецепторы. Активированные ДК при ко-культивировании с наивными Т-клетками будут запускать их дифференцировку в про- или противовоспалительный тип.

Работа выполнена за счет гранта РФФ 20-64-47020.

*Список литературы:*

1. *Pickard J.M., Chervovsky A.V.* Intestinal fucose as a mediator of host–microbe symbiosis. *J. Immunol* (2015). DOI [10.4049/jimmunol.1500395](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500395)

2. *Konieczna P. et al.*, Human dendritic cell DC-SIGN and TLR-2 mediate complementary immune regulatory activities in response to *Lactobacillus rhamnosus JB-1*. PLoS ONE (2015). DOI 10.1371/journal.pone.0120261

3. *Kabelitz D., Wesch D., Oberg H.H.* Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. Crit Rev Immunol (2006). DOI 10.1615/critrevimmunol.v26.i4.10.

## Полисахариды в тканевой инженерии

Скорик Ю.А.<sup>1</sup>, Петрова В.А.<sup>1</sup>, Пошина Д.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: yury\_skorik@mail.ru

Полисахариды являются перспективными полимерами для тканевой инженерии благодаря своей биосовместимости, биodeградируемости, низкой токсичности, способности взаимодействовать с клетками ткани и стимулировать их рост. Полисахариды могут быть классифицированы по нескольким критериям, таким как источник (животные, растения, микроорганизмы), химическая природа (мономерный состав), структура (линейная и разветвленная), функция в организме (структурные, накопительные и секретируемые полисахариды), наличие ионогенных групп (нейтральные, катионные, анионные, амфотерные), по их биodeградируемости в организме. Наиболее широко используемые в тканевой инженерии полисахариды включают хитозан, альгинат, гиалуронан и целлюлозу. Для повышения биоактивности тканеинженерных конструкций полисахариды сочетают с другими природными или синтетическими полимерами, армируют неорганическими наночастицами, проводят поверхностную модификацию или загружают различными биоактивными молекулами (факторы роста и лекарственные средства). Полисахариды применяются для инженерии и регенерации практически всех тканей, хотя в основном на экспериментальном уровне. Полисахариды применяются в различных формах, таких как инъекционные гидрогели или пористые и волокнистые скаффолды, последние часто создаются с помощью технологии электроспиннинга. В докладе рассматриваются последние достижения в области тканеинженерных конструкций на основе полисахаридов, приводятся примеры как из литературных источников, так и собственных работ авторов [1-4].

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-29-17074).

### Список литературы:

1. Petrova V.A., Khripunov A.K., Golovkin A.S., Mishanin A.I., Gofman I.V., Romanov D.P., Migunova A.V., Arkharova N.A., Klechkovskaya V.V., Skorik Y.A. Bacterial cellulose (*Komagataeibacter rhaeticus*) biocomposites and their cytocompatibility. *Materials* (2020) DOI 10.3390/ma13204558
2. Petrova V.A., Golovkin A.S., Mishanin A.I., Romanov D.P., Chernyakov D.D., Poshina D.N., Skorik Y.A. Cytocompatibility of bilayer scaffolds electrospun from chitosan/alginate-chitin nanowhiskers. *Biomedicines* (2020) DOI 10.3390/biomedicines8090305
3. Petrova V.A., Chernyakov D.D., Poshina D.N., Gofman I.V., Romanov D.P., Mishanin A.I., Golovkin A.S., Skorik Y.A. Electrospun bilayer chitosan/hyaluronan material and its compatibility with mesenchymal stem cells. *Materials* (2019) DOI 10.3390/ma12122016
4. Kiroshka V.V., Petrova V.A., Chernyakov D.D., Bozhkova Y.O., Kiroshka K.V., Baklagina Y.G., Romanov D.P., Kremnev R.V., Skorik Y.A. Influence of chitosan-chitin nanofiber composites on cytoskeleton structure and the proliferation of rat bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2017). DOI 10.1007/s10856-016-5822-2

## Оптимизация продукции экстраклеточных полисахаридов *Paenibacillus polymyxa* и перспективы их биотехнологического использования

Федоненко Ю.П., Гринёв В.С., Сигида Е.Н., Трегубова К.В., Егоренкова И.В.

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия*

*E-mail: [fedonenko\\_yu@ibppm.ru](mailto:fedonenko_yu@ibppm.ru)*

Род *Paenibacillus* включает около 200 видов факультативно анаэробных, эндоспорообразующих грамположительных бактерий с типовым видом *Paenibacillus polymyxa*. Эти бактерии широко распространены в окружающей среде, но в основном обнаруживаются в ризосфере и в тканях растений. Они стимулируют рост растений, продуцируя широкий спектр биологически активных веществ, таких как антибиотики, фитогормоны, литические ферменты, а также различные экстраклеточные полисахариды (ЭПС).

Целью данной работы являлось выделение ЭПС из двух штаммов *P. polymyxa*, определение структуры и характеристика физико-химических свойств выделенных полимеров, а также оптимизация условий культивирования для увеличения выхода ЭПС.

Было показано, что при культивировании в жидкой минеральной среде с сахарозой в качестве источника углерода *P. polymyxa* 92 и 88А синтезируют ЭПС, основная фракция которых по данным ИК-Фурье спектроскопии, моносахаридного анализа и ЯМР-спектроскопии представляет собой линейный фруктан (леван) с молекулярно-массовым распределением  $2,29-1,10 \times 10^5$  и  $2,3-2,1 \times 10^6$  Да, соответственно. Методом термогравиметрии с дифференциальной сканирующей калориметрией и масс-спектрометрическим детектированием газообразных продуктов термолиза, была охарактеризована термическая стабильность полимеров. Водные растворы ЭПС были маловязкими, демонстрировали псевдопластические свойства и хорошую способность эмульгировать гидрофобные вещества (подсолнечное масло, *o*-ксилол, *n*-гексадекан). Сорбционная емкость ЭПС по ряду распространенных тяжелых металлов увеличивалась в порядке  $Zn(II) < Cd(II) < Pb(II) < Cu(II)$  и была максимальной ( $q = 481$  и  $440$  мг / г для штаммов 92 и 88А) для  $Cu(II)$ . На основе растворов ЭПС в 1% уксусной кислоте с добавлением глицерина и бентонита в качестве связующего были получены образцы композиционных пленок, характеризующихся термомеханической пластичностью и пористостью ( $\square = 16.0-182.8$  Å). Обработка семян пшеницы раствором ЭПС значительно увеличивала длину корней и побегов проростков.

## ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

### Исследование влияния фукополисахаридов на бактериальные клетки методом АСМ

Айрапетян О.Н.<sup>1,2,3</sup>, Лапина И.М.<sup>1,2</sup>, Облучинская Е.Д.<sup>4</sup>, Журишкина Е.В.<sup>1,2</sup>, Скорик Ю.А.<sup>5</sup>, Лебедев Д.В.<sup>1,2,6</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» Гатчина, Россия

<sup>2</sup>Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия

<sup>5</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup>Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, Москва, Россия

E-mail: [ayrapetyan\\_on@pnpi.nrcki.ru](mailto:ayrapetyan_on@pnpi.nrcki.ru)

Для детального исследования действия антибактериальных соединений на микроорганизмы наглядным методом является атомно-силовая микроскопия, при помощи которой можно определить целостность поверхности, шероховатость и механическую жесткость бактерии. Однако, для изучения морфологических изменений бактерий, обработанных фукоиданами, методы АСМ до сих пор практически не использовались.

Целью работы являлось исследование антибактериальных свойств двух фракций сульфатированных полисахаридов разной степени очистки из бурых водорослей *Fucus vesiculosus* в отношении *E. coli*, *B. licheniformis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* [1].

Анализ морфологических изменений у бактерий после обработки фукоиданами при значениях МИК в течение 24 ч при помощи АСМ показал, что целостность всех бактериальных клеток сохранялась, что коррелирует с выявленными бактериостатическими, а не бактерицидными свойствами исследуемых полисахаридов. У грамположительных бактерий наблюдалось значительное уменьшение размера, сопровождающееся некоторым увеличением шероховатости поверхности, что могло указывать на изменение свойств клеточной стенки из-за влияния фукоиданов на метаболизм бактерий или связывание фукоидана с поверхностью клетки. Однако, несмотря на выраженное бактериостатическое действие фукоиданов в отношении *E. coli*, у этих бактерий не было замечено никаких морфологических изменений, возможно, из-за наличия внешней мембраны. Следовательно, похоже, что изменения в морфологии клеток, наблюдаемые у грамположительных бактерий, представляют собой следствие бактериальной адаптации, а не механизм ингибирования роста фукоиданами. Мы наблюдали значительное уменьшение размеров *S. aureus* и *S. epidermidis* при обработке сульфатированными полисахаридами. Для палочковидных бактерий ни один из фукоиданов не оказал существенного влияния на размер клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663.

#### Список литературы:

1. Айрапетян, О.Н.; Obluchinskaya, E.D.; Zhurishkina, E.V.; Skorik, Y.A.; Lebedev, D.V.; Kulminskaya, A.A.; Lapina, I.M. Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae

Fucus vesiculosus L. of the Barents Sea. *Biology* **2021**, *10*, 67.  
<https://doi.org/10.3390/biology10010067>

## Синтез и реакционная способность гликозидов иодониевых солей

*Беккер Г.В., Степанова Е.В.*

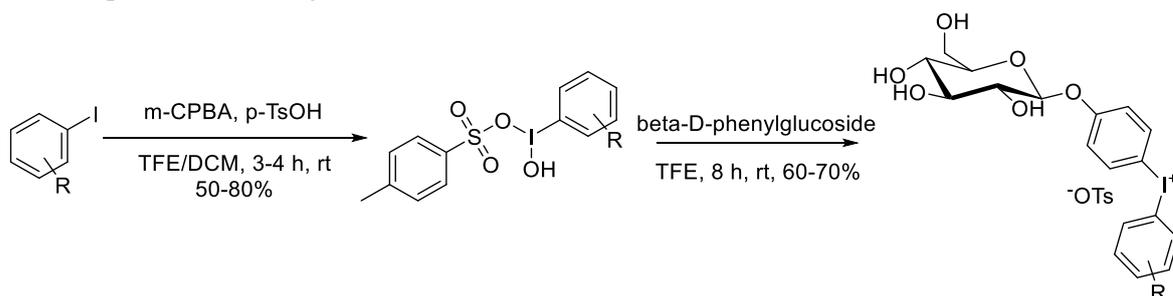
ФГАОУ ВО НИ ТПУ, г. Томск, РФ

E-mail: [gyb5@tpu.ru](mailto:gyb5@tpu.ru)

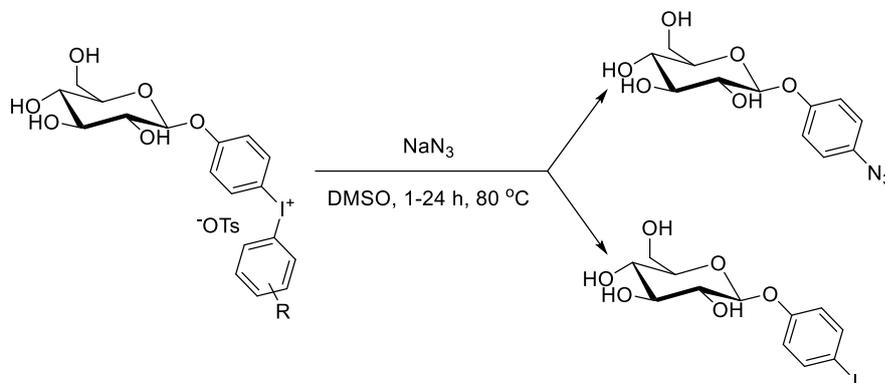
Гликозиды иодониевых солей – это бифункциональные органические молекулы, в которых один из лигандов иодониевой соли посредством гликозидной связи связан с углеводным остатком. Поскольку иодониевые соли уже получили широкое распространение как стерео- и региоселективные арилирующие и функционализирующие агенты [1], используемые как для синтеза сложных органических субстратов [2], так и для ковалентной модификации материалов [3], их сочетание с углеводами может привести к созданию новых биологически-активных соединений специфически распознаваемых животными и бактериальными клетками, а ароматический агликон может служить как линкером, так и придавать особую биологическую активность.

Целью данной работы было синтезировать гликозиды иодониевых солей из незащищенного  $\beta$ -D-фенилгликопиранозида в одну стадию и исследовать реакционную способность этих соединений в реакции восстановительного элиминирования в присутствии азид натрия.

Для получения гликозидов иодониевых солей были синтезированы соответствующие реактивы Козера из иодаренов, после чего в ходе реакции лигандного обмена с  $\beta$ -D-фенилгликопиранозидом получались целевые соединения.



Полученные гликозиды в реакции восстановительного элиминирования в присутствии азид натрия образовывали 4-иод- $\beta$ -D-фенилгликопиранозид в случае, когда лиганд иодониевой соли содержал электроноакцепторные группы, и 4-азид- $\beta$ -D-фенилгликопиранозид, когда лиганд был более сильным электронодонором.



Таким образом, в результате данной работы были впервые синтезированы гликозиды иодониевых солей в одну стадию из незащищенного арилгликозида, а также была исследована реакционная способность этих соединений в реакции восстановительного элиминирования в присутствии азид натрия. Варьируя лиганд иодониевой соли, не

связанный с углеводным фрагментом, удалось направить нуклеофильное замещение как в кольцо данного лиганда, так и в бензольное кольцо гликозида.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-73-10211

*Список литературы:*

1. *Aradi, K., Novák, Z.* Copper-Catalyzed Oxidative Ring Closure of ortho-Cyanoanilides with Hypervalent Iodonium Salts: Arylation–Ring Closure Approach to Iminobenzoxazines. *Synth Catal*, 2018, doi:10.1002/adsc.201400763
2. *Zhdankin, V.V., Stang, P.J.* Recent Developments in the Chemistry of Polyvalent Iodine Compounds. *Chem Rev*, 2002, doi:10.1021/cr010003
3. *He, M., Swager, T.M.* Covalent Functionalization of Carbon Nanomaterials with Iodonium Salts. *Chem Mater*, 2016, doi:10.1021/6b03078

## Характеристика рекомбинантной эндо-глюканазы 7 семейства гликозидгидролаз из мицелиального гриба *Scytalidium candidum* ЗС.

Бобров К.С.<sup>1,2</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>2</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина.

E-mail: Bobrov\_ks@npi.nrcki.ru

Целлюлазы представляют собой группу ферментов, расщепляющих природный полисахарид целлюлозу до глюкозы. Данные ферменты находят широкое применение во многих различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине [1,2].

Известно, что мицелиальный гриб *S. candidum* ЗС является высокоактивным продуцентом гемицеллюлазного комплекса ферментов [3,4]. При этом результаты сравнительного анализа генома и секретомы *S. candidum* ЗС указывают на то, что некоторые целлюлазы не секретируются либо секретируются в следовых количествах при использованных условиях роста микроорганизма [4].

Ген DH86\_00000422, кодирующий эндо-глюканазу 7 семейства гликозидгидролаз, был клонирован в вектор pPICZα. Рекомбинантный белок был экспрессирован в дрожжевых клетках *Pichia pastoris* GH115. Очищенный фермент проявлял гидролитическую активность в отношении микрокристаллической целлюлозы, Avicell и карбоксиметилцеллюлозы. Была определена зависимость активности и стабильности эндо-глюканазы от pH среды и температуры. Показано, что фермент катализирует реакцию гидролиза синтетического модельного субстрата пара-нитрофенил целлобиозида. Кинетические параметры  $K_M$  и  $k_{cat}$  данной реакции были определены и составили 2,85 мМ и 1,14 с<sup>-1</sup> соответственно.

### Список литературы:

1. Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, 6(3), 44.
2. Hu, Y. Et al. (2021). Current Status of Mining, Modification, and Application of Cellulases in Bioactive Substance Extraction. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 687–703.
3. Родионова Н.А. и др. (1984). Целлюлолитические ферменты *Geotrichum candidum*. *Микробиология*, 53, 237–241.
4. Павлов, И. Ю. и др. (2018). Комплексный анализ углеводов-активных ферментов мицелиального гриба *Scytalidium candidum* ЗС. *Биохимия*, 83(11), 1722–1735.

## Характеристика физико-химических и антигенных свойств липополисахарида *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и его модифицированных производных

*Демидова А.С.<sup>1</sup>, Кузнецова Е.В.<sup>1</sup>, Сигида Е.Н.<sup>2</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов*

<sup>2</sup>*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов*

*E-mail: DAS333.01@yandex.ru*

Бактерии рода *Ochrobactrum* широко распространены в природе и имеют медицинское и биотехнологическое значение. Структура и свойства липополисахаридов (ЛПС) представителей данного рода бактерий относительно мало изучены. Ранее была описана структура О-специфического полисахарида (ОПС) *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 и показана рост-стимулирующая активность ЛПС этого штамма в отношении микрорастений картофеля [1].

Целью данной работы было получение модифицированных препаратов ЛПС и ОПС *O. cytisi* IPA7.2 и изучение их химического состава, физико-химических и антигенных свойств. ОПС был получен мягким кислотным гидролизом ЛПС (2% АсОН, 100 °С, 3 ч) и выделен с выходом 23% гель-проникающей хроматографией в 0,05М пиридин-ацетатном буфере рН 4,5 на колонке Sephadex G-50. Дезацелирование ОПС и ЛПС проводили в щелочных условиях (12% NH<sub>4</sub>ОН, 37 °С, 16 ч). Образовавшиеся ДПС и ДЛПС обессоливали на колонке TSK HW-40 (S) в 1% АсОН, их выход составил 90 и 60% соответственно.

Анализ состава жирных кислот в препаратах ЛПС и ДЛПС показал преобладание остатков 3-гидрокситетрадекановой [14:0(3-ОН)], 3-гидроксигексадекановой [16:0(3-ОН)], 11,12-метилен-октадекановой [19<sup>c</sup>:0] и 27-гидроксиоктакозановой [28:0(27-ОН)] кислот.

Полученные препараты были исследованы методом динамического рассеяния света на способность формирования надмолекулярных частиц (НМЧ) в водной среде. Для водных растворов (2 мг/мл) НМЧ были выявлены только для препаратов ЛПС и ДЛПС (с диаметром частиц 65,6±6,8 нм и 35,7±6,6 нм соответственно). Дзета-потенциал НМЧ составил –21,9±0,3 мВ для ЛПС и –29,5±1,7 мВ для ДЛПС.

Иммунохимическими методами показано, что препараты ДЛПС и липида А реагировали с антителами к О-антигену *O. cytisi* IPA7.2. Методом линейного иммуноэлектрофореза установлено, что антигенные свойства ЛПС и ДЛПС идентичны. Эти данные свидетельствуют о том, что нестехиометрическое ацелирование ОПС *O. cytisi* IPA7.2 не оказывает существенного влияния на взаимодействие со специфическими антителами.

### *Список литературы:*

1. Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdrovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.017

## Выделение и начальная характеристика $\alpha$ -L-фукозидазы из гепатопанкреаса краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*

Ешимов А.<sup>1,2</sup>, Швецова С. В.<sup>1,2</sup>, Энейская Е. В.<sup>1</sup>, Кульминская А. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатowski институт» - ПИЯФ, Гатчина

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Олигосахаридные цепи, содержащие L-фукозу, играют важную роль в физиологических и патологических процессах млекопитающих, а также являются структурными компонентами биологически значимых природных соединений [1].  $\alpha$ -L-фукозидазы – ферменты класса гидролаз, способные избирательно удалять L-фукозу, не нарушая общую структуру целой фукозилированной молекулы. В связи с этим они являются важными инструментами для определения структуры и биологических функций различных фукоолигосахаридов [2].

В настоящей работе с использованием модельных хромофорных субстратов *n*-нитрофенил гликозидов определен спектр ферментативных активностей из гепатопанкреаса краба камчатского *Paralithodes camtschaticus*, являющегося промышленно добываемым организмом и перспективным источником ценных ферментов [3]. Наиболее высокий уровень активности показали ферменты  $\beta$ -D-галактозидаза,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкозидаза и  $\alpha$ -L-фукозидаза. Разработана первичная схема выделения и получен частично-очищенный ферментный препарат  $\alpha$ -L-фукозидазы из *P. camtschaticus*. Масса нативного ферментного препарата  $\alpha$ -L-фукозидазы составила  $95 \pm 5$  кДа. Определены оптимальные значения pH реакции гидролиза модельного субстрата *n*-нитрофенил- $\alpha$ -L-фукопиранозида (*pNPFuc*): фермент проявляет наибольшую активность при pH 3,5 – 4,5 и стабилен в диапазоне pH 4,0 – 7,5. Показано, что  $\alpha$ -L-фукозидаза из *P. camtschaticus* способна катализировать реакцию трансгликозилирования с использованием *pNPFuc* в качестве донора и акцептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке «КГЦ – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075-15-2019-1663.

### Список литературы:

1. Zhao YP, Xu XY, Fang M, Wang H, You Q, Yi CH, Ji J, Gu X, Zhou PT, Cheng C, Gao CF. Decreased core-fucosylation contributes to malignancy in gastric cancer. *PLoS One*, 2014, 9(4), e94536.
2. Sakurama H, Tsutsumi E, Ashida H, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H. Differences in the substrate specificities and active-site structures of two  $\alpha$ -L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2012;76(5):1022-1024.
3. Ponomareva T, Timchenko M, Filippov M, Lapaev S, Sogorin E. Prospects of Red King Crab Hepatopancreas Processing: Fundamental and Applied Biochemistry. *Recycling*. 2021; 6(1):3.

**Биорезорбируемые перевязочные материалы на основе бактериальной целлюлозы: исследование изменения надмолекулярной и кристаллической структуры бактериальной целлюлозы в процессе ферментативного гидролиза**

*Иванова Л. А.<sup>1,2</sup>, Горшкова Ю. Е.<sup>4</sup>, Бурдаков В.С.<sup>1,2</sup>, Верлов Н.А.<sup>1,2</sup>, Баранчиков А.Е.<sup>3</sup>,  
Копица Г.П.<sup>1,4</sup>, Кульминская А. А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>НИИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, г.Гатчина;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва;

<sup>3</sup>Институт общей и неорганической химии им. Курнакова РАН, Москва;

<sup>4</sup>Лаборатория нейтронной физики им. Франка, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Московская область.

*E-mail: Ivanova\_la@npi.nrcki.ru*

Бактериальная целлюлоза (БЦ) - это механически прочный гидрогель, синтезируемый некоторыми штаммами грам-положительных и грам-отрицательных бактерий, построен из наноразмерной сети целлюлозных цепей, образующих кристаллические (до 90 об.%) и аморфные (10 об.%) структурные фрагменты [1]. Уникальные физико-химические и биологические свойства БЦ имеют важное значение для разработки биомедицинских устройств, в том числе, самостоятельных и композитных перевязочных материалов [2]. Однако одним из важных ограничений для широкого использования этого материала в инженерии кожной ткани и заживлении ран является его низкая биodeградируемость из-за отсутствия целлюлаз у людей [3].

В настоящей работе бактериальную целлюлозу, синтезированную штаммом *Glucosacetobacter hansenii* ATCC 10821, впервые обрабатывали целлобиогидролазой из дрожжевого гриба *Scytalidium candidum* ЗС (СВНСс). Кристаллическая и надмолекулярная структура БЦ на разных стадиях ферментативного гидролиза изучалась методами: рентгеновской дифракции, малоуглового и ультрамалого углового рассеяния нейтронов, атомно-силовой (АСМ) и сканирующей микроскопии (СЭМ), а также низкотемпературной адсорбции азота. Комплексный анализ экспериментальных данных показывает, что ферментативный гидролиз оказывает существенное влияние на как кристаллическую, так и надмолекулярную структуру нативной нано-гель пленки БЦ, представляющей собой 3D полимерную сеть, состоящую из нанолент с толщиной  $T \approx 8$  нм и шириной  $W \approx 50$  нм и с развитой удельной поверхностью СБЭТ  $\approx 260$  м<sup>2</sup>·г<sup>-1</sup>. Обнаружено, что биodeградация в течение 24 часов приводит, во-первых, к уменьшению ( $\approx 10\%$ ) среднего размера кристаллов Dhkl БЦ, во-вторых, к значительному увеличению размеров нанолент и, в-третьих, к существенному уменьшению удельной поверхности до СБЭТ  $\approx 100$  м<sup>2</sup>·г<sup>-1</sup>. В то же время установлено, что добавление фермента в образцы БЦ не приводило к токсическим эффектам ни в экспериментах *in vitro* на клеточных линиях, ни в экспериментах *in vivo* на крысах, а также показало большую эффективность в сравнении со стандартной терапией.

В настоящий момент проводятся исследования структуры БЦ, гидролизованной другим ферментом – мутантной β-глюкозидазой из гриба *Scytalidium candidum* ЗС, обладающей большей ферментативной активностью, однако действующей по другому молекулярному механизму. Нашей целью является подбор наиболее эффективной схемы ферментативного гидролиза для разработки биорезорбируемого материала на основе БЦ.

*Список литературы:*

1. Xue Y., Mou Z., Xiao H. Nanocellulose as a sustainable biomass material: structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications // *Nanoscale*. 2017. № 39 (9). С. 14758–14781
2. Bacakova L. [и др.]. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing // *Nanomaterials*. 2019. № 2 (9). С. 164.
3. Wu Y. [и др.]. Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure // *Carbohydrate Polymers*. 2012. № 3 (88). С. 1023–1032.

## **Изучение обмена гликолипидов между эндотелиальными клетками и бактериями**

*Комарова В.А., Хайдуков С.В., Рыжов И.М., Попова И.С., Бовин Н.В., Рапопорт Е.М.*

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.*

*Овчинникова РАН, Москва, Россия*

*E-mail: veronika12.98@yandex.ru*

Известно, что гликолипиды, высвобождающиеся из клетки, встраиваются в эукариотические или бактериальные клетки, в результате чего мембрана клетки-акцептора приобретает некоторые черты клетки-донора. Можно также ожидать, что бактери-акцепторы не будут узнаваться эффекторами врожденного и приобретенного иммунитета. Целью данного исследования было изучение переноса липидных молекул с клеток на бактерии, для этого использовали синтетические аналоги природных гликолипидов, под названием FSL (functional spacer lipid), благодаря наличию остатка DOPE они сохраняют способность природных гликолипидов встраиваться в мембрану клетки. Эксперименты проводились с FSL-Fluo и FSL-Atetra (Atetra = GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ ) в статических условиях и в потоке. Результаты анализировались с помощью цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Бактерии добавляли к монослою клеток со встроенным FSL, или пропускали через проточные слайды, в которых в виде монослоя находятся клетки со встроенным FSL. Показано, что 1) перенос FSL-конструктов на бактерии происходит только в потоке; 2) перенос FSL-A происходит при более высокой скорости потока, чем перенос FSL-Fluo. Чтобы понять, по какому механизму происходит перенос FSL на бактерии, из клеток со встроенным FSL были выделены микровезикулы, которые смешивали с бактериями при разных скоростях потока. Процесс выхода FSL-A из микровезикул и встраивание в бактерии происходил медленнее и при более высоких скоростях, чем FSL-Fluo.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №20-04-00677.

**Сравнительный анализ сульфатированных полисахаридов водорослей  
семейства Phyllophoraceae**

*Кравченко А.О., Ермак И.М.*

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

*E-mail: kravchenko\_25.89@mail.ru*

Phyllophoraceae является одним из крупнейших семейств красных водорослей отряда Gigartinales и насчитывает около 132 представителей. Среди них наиболее изученными с точки зрения структуры и свойств полисахаридов (ПС) являются водоросли родов *Gymnogongrus*, *Ahnfeltiopsis*, *Stenogramme*, *Mastocarpus*, *Coccotylus*, для которых характерен сложный жизненный цикл. Основными структурными ПС этих водорослей являются сульфатированные галактаны, построенные либо исключительно из звеньев каррабиозы [1], либо представляющие собой сложные D/L-гибриды [2]. ПС красных водорослей обладают рядом полезных физико-химических и биологических свойств, которые обусловлены особенностями их тонкой структуры. Анализ собственных и литературных данных свидетельствует о зависимости структурных особенностей ПС водорослей семейства Phyllophoraceae от стадии их жизненного цикла.

Установлено, что ПС из гаметофитов *Mastocarpus stellatus* и *M. pacificus* имеют гибридную  $\kappa/\iota$ -структуру с минорными включениями их биосинтетических предшественников ( $\mu$ - и/или  $\nu$ -звеньев), тогда как ПС *Coccotylus truncatus* представляет собой  $\iota$ -каррагинан с минорными включениями  $\nu$ - и  $\alpha$ -звеньев. В то же время водоросли рода *Gymnogongrus* (*G. griffithsiae*, *G. tenuis*, *G. torulosus*) продуцируют ПС с более сложной структурой и помимо  $\iota/\kappa$ -каррагинана для первых двух представителей и  $\kappa/\iota$ -каррагинана для третьего содержат значительные количества агароподобного сульфатированного ПС. ПС из гаметофитов водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, широко распространенной в ДВ морях, представляет собой  $\kappa/\beta$ -каррагинан, тогда как из цистокарпов –  $\iota/\kappa$ -каррагинан с минорными количествами агароподобного ПС, замещенного ксилозой при С-6  $\beta$ -D-галактозы. ПС из цистокарпов *Stenogramme interrupta* представляет собой  $\iota/\alpha$ -каррагинан. Особого внимания заслуживают тетраспорофиты водорослей Phyllophoraceae, которые в отличие от гаметофитов, продуцируют в основном ПС, отнесенные к  $\lambda$ -семейству каррагинанов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-73-00089.

*Список литературы:*

1. Hillou L., Larotonda F.D.S., Abreu P., Ramos A.M., Sereno A.M., Goncalves M.P. Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of  $\kappa/\iota$ -hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. *Biomolecular Engineering* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.04.003>
2. Kravchenko A.O., Anastuyk S.D., Sokolova E.V., Isakov V.V., Glazunov V.P., Helbert W., Yermak I.M. Structural analysis and cytokine-induced activity of gelling sulfated polysaccharide from the cystocarpic plants of *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Carbohydrate Polymers* (2016). doi:10.1016/j.carbpol.2016.05.086

## Противовирусный потенциал каррагинанов, выделенных из красных водорослей Японского моря

Крылова Н.В.<sup>1</sup>, Кравченко А.О.<sup>2</sup>, Иунихина О.В.<sup>1</sup>, Потт Н.Б.<sup>1</sup>, Ермак И.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

E-mail: [imyur@mail.ru](mailto:imyur@mail.ru)

Поиск противовирусных соединений, эффективно блокирующих размножение широкого спектра вирусов человека, и разработка на их основе новых лекарств весьма актуальны. Сульфатированные галактаны красных водорослей представляют вполне оправданный интерес как потенциальные противовирусные терапевтические средства благодаря их биосовместимости, доступности и широкому спектру биологической активности, которая определяется структурными особенностями этих полисахаридов.

Проведено изучение противовирусной активности *in vitro* в отношении вирусов простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) и энтеровируса (ЕСНО-1) четырех типов каррагинанов (К): К1 – нефракционированный К из *S. armatus* ( $\kappa+\lambda$ ); К2 –  $\kappa/\beta$ -К из *T. crinitus*; К3 –  $\nu/\kappa$ -К из *A. flabelliformis*; К4 – олигосахарид  $\nu/\kappa$ . Исследуемые полисахариды различаются строением полимерной цепи, количеством сульфатных групп ( $K1 > K3 > K2$ ) и их местоположением.

Цитотоксическую активность К и их влияние на репродукцию вирусов в перевиваемой культуре клеток Vero оценивали с помощью МТТ-анализа. Установлена способность К повышать устойчивость клеток к заражению. Все образцы обладают выраженной противовирусной активностью, проявляя различную эффективность на разные стадии жизненного цикла вируса. При обработке клеток Vero полисахаридами до их инфицирования ВПГ-1 (профилактическое действие) самую выраженную антигерпетическую активность проявлял К2; тогда как при непосредственной обработке ВПГ-1 (вирулицидный эффект) наиболее значительное антигерпетическое действие демонстрировал К1. При исследовании анти-энтеровирусной активности среди четырёх соединений К2 также наиболее эффективно подавлял репродукцию ЕСНО-1, особенно при его профилактическом воздействии на клетки. При этом Ацикловир®, широко используемый при лечении герпес-вирусных инфекций, не проявлял какой-либо активности при этих способах применения. Выявленные различия по влиянию К на разные стадии жизненного цикла вирусов, связаны как с особенностями структуры тестируемых соединений и их макромолекулярной организацией, так и с особенностями репликации вирусов – ВПГ-1 (ДНК-содержащий оболочечный вирус) и ЕСНО-1 (РНК-содержащий безоболочечный вирус). Полученные результаты позволяют рассматривать К как перспективные противовирусные соединения широкого спектра действия.

Работа поддержана грантом РФ № 21-74-20019.

## Оценка надмолекулярной структуры липополисахаридов ризосферных бактерий в растворах по интенсивности флуоресценции N-фенил-1-нафтиламина

*Кузнецова Е.В.<sup>1</sup>, Демидова А.С.<sup>1</sup>, Бурыгин Г.Л.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: [Evgeniya1709Kyznetsova@yandex.ru](mailto:Evgeniya1709Kyznetsova@yandex.ru)

Липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий – основной компонент клеточной поверхности, отвечающий за взаимодействие клетки с объектами окружающей его среды. У ризосферных бактерий ЛПС участвует в прикреплении микроорганизмов к растительным клеткам и запускает реакции фитоиммунитета. Физико-химические свойства ЛПС в значительной степени зависят от надмолекулярной организации молекул. При концентрациях выше критической концентрации агрегации ЛПС водных растворов образуют простые однослойные мицеллы. Одним из методов определения критической концентрации мицеллообразования (СМС) является использование различия в уровне флуоресценции N-фенил-1-нафтиламина (NPN) в растворах и составе мицелл [1]. Целью данной работы было определение значений СМС для ЛПС 8 штаммов ризосферных бактерий.

ЛПС ризосферных штаммов *Azospirillum brasilense* SR7, SR80, Sp107, SpBr14, Sp246, *Azospirillum baldaniorum* Sp245, *Herbaspirillum autotrophicum* В-1394, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 растворяли в 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl буфере (рН 7,5) в диапазоне концентраций 2-500 мкг/мл и добавляли раствор 10 мкМ NPN. Измерение флуоресценции проводили в диапазоне длин волн 350-500 нм при длине возбуждения 310 нм [2]. Анализ спектров флуоресценции растворов ЛПС показал присутствие выраженного пика 380 нм. Интенсивность флуоресценции была прямо пропорциональна концентрации ЛПС. Значение СМС для ЛПС различных штаммов была определена графически [1]. СМС ЛПС шести штаммов составили 7-22 мкг/мл, для ЛПС штамма IPA7.2 – 65 мкг/мл и ЛПС штамма В-1394 – 240 мкг/мл. Дезацилирование ЛПС приводило к снижению значений СМС, что может быть связано с уменьшением объема липидной фазы в надмолекулярных частицах и, соответственно, уменьшением числа молекул, необходимых для формирования мицелл.

Таким образом, СМС ЛПС большинства ризосферных штаммов составили около 10-20 мкг/мл. Результаты работы могут быть полезны для понимания различий в биологической и физиологической активности молекул ЛПС при различных концентрациях.

### Список литературы:

1. Aurell C.A., Wistrom A.O. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998). DOI: 10.1006/bbrc.1998.9773
2. Brito R.M., Vaz W.L. Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine. *Anal. Biochem.* (1986). DOI: 10.1016/0003-2697(86)90406-9

# Влияние κ-каррагинана на структурное состояние амилоидных фибрилл лизоцима: экспериментальные и расчетные подходы к исследованию агрегации и дезагрегации

*Макшакова О.Н.<sup>1,3</sup>, Богданова Л.Р.<sup>1,3</sup>, Ермакова Е.Е.<sup>1,3</sup>, Седов И.А.<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский федеральный университет, Казань, Россия

<sup>3</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

E-mail: [olga.makshakova@kibb.knc.ru](mailto:olga.makshakova@kibb.knc.ru)

Большая группа дегенеративных заболеваний, известных как амилоидоз, обусловлена неправильным фолдингом белков и их отложением в тканях в форме амилоидных фибрилл. Многие белки формируют патологические амилоидные агрегаты, и независимо от типа нативной структуры, причем агрегация всегда происходит за счет β-слоистых структурных элементов (Uversky & Fink, 2006). Одним из подходов к лечению подобных заболеваний является введение соединений, специфически взаимодействующих с фибриллами и вызывающих ренатурацию целевого белка (Wang, Yu, Patal, Chuang, Zhang, & Zheng, 2013). Поли- и олигосахариды, являющиеся биосовместимыми и биоразлагаемыми соединениями, представляют, в связи с этим, особый интерес.

В данной работе мы исследовали взаимодействия κ-каррагинана с модельным белком - лизоцимом куриного яичного белка с применением экспериментальных и расчетных методов. ИК-спектроскопия использовалась для детектирования структурных изменений как в белке, так и в полисахариде при комплексообразовании (Makshakova, Faizullin, Zuev, 2020). Анализ спектров показал, что κ-каррагинан и лизоцим формируют полиэлектролитные комплексы, причем связывание полисахарида происходит в области β-структур. Для оценки структуры комплексов была построена вероятностная модель. Поскольку процессы комплексообразования характеризуются большими пространственными и/или временными масштабами, в частности, структурной подстройки белков и сложных углеводов, был применен метод ускоренной молекулярной динамики в совокупности с методом молекулярного докинга.

Авторы благодарны за финансовую поддержку РФФИ (грант № 19-315-51012), а также за предоставление доступа к центру коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Казанского федерального университета (Казань, Россия) и Научно-технологического университета «Сириус» (Сочи, Россия).

## Список литературы:

1. Uversky, V. N., Fink, A. (2006) Protein Misfolding, Aggregation and Conformational Diseases: Part A: Protein Aggregation and Conformational Diseases. Springer. (Volume 4) ISBN 978-0-387-25919-2.
2. Wang, Q., Yu, X., Patal, K., Hu, R., Chuang, S., Zhang, G., Zheng, J. (2013). Tanshinones inhibit amyloid aggregation by amyloid-β peptide, disaggregate amyloid fibrils, and protect cultured cells. ACS Chemical Neuroscience, 4(6), 1004–1015. DOI 10.1021/cn400051e.
3. Makshakova, O.N., Faizullin, D.A., Zuev, Yu.F. (2020). Interplay between secondary structure and ion binding upon thermoreversible gelation of κ-carrageenan. Carbohydrate Polymers. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.115342.

4. *Ermakova, E.A., Makshakova, O.N., Zuev, Yu.F. Sedov, I.A.* (2021) Fibril fragments from the amyloid core of lysozyme: An accelerated molecular dynamics study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* DOI 10.1016/j.jmgm.2021.107917.

## **Фосфорилированные пектины и перспективы их практического использования**

*Мамедов Э.И.<sup>1</sup>, Дергунова Е.С.<sup>1</sup>, Архипова А.А.<sup>2</sup>, Калмыкова Е.Н.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Липецкий государственный технический университет, Липецк, Россия*

*<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт» - ИРЕА, Москва, Россия*

*E-mail: veter1407@rambler.ru*

Модификация полисахаридов – новое направление в молекулярном дизайне биополимеров с заранее запрограммированными свойствами. Это стимулирует поиск эффективных, менее трудоемких и дорогостоящих методов модификации природных гликанов для получения новых материалов [1].

Цель исследования - получение фосфорилированных пектинов (яблочный, цитрусовый, и «зостерин-ультра», реализуемые через розничную торговлю), определение их водоудерживающей способности, гликемического индекса и биологической активности. Фосфорилирование пектинов проводили по методике [2].

Установлено, что водоудерживающая способность (г H<sub>2</sub>O/г образца), позволяющая регулировать водный баланс в организме человека, для фосфорилированных пектинов выше по сравнению с исходными. Для исходного яблочного пектина она составляет 0,038, для фосфорилированного – 0,046; для исходного цитрусового пектина – 0,035, для фосфорилированного – 0,036; для исходного зостерана – 0,090, для фосфорилированного – 0,096.

Фосфорилированные пектины отличаются меньшим значением гликемического индекса по сравнению с нативными, что делает их перспективными для использования в медицине, пищевой промышленности и диетологии. Гликемический индекс (мл) исходного и фосфорилированного яблочного пектина равен 10,625 и 9,444 соответственно; исходного и модифицированного цитрусового пектина – 10 и 9,333; исходного и фосфорилированного зостерана – 33 и 29 соответственно.

Для сравнения биологической активности пектинов проведена оценка прорастания семян огурцов при добавлении к ним пектинов различной природы и концентрации. Установлено, что фосфорилированные полисахариды характеризуются более высокой ростостимулирующей активностью, максимальное прорастание отмечено для семян, обработанных фосфорилированным яблочным пектином – 23 мм (концентрация 3%) и 104 мм (концентрация 0,002%). При обработке фосфорилированным цитрусовым пектином прорастание составило 21 мм (концентрация 3%), фосфорилированным зостераном – 19 мм (концентрация 3%).

### *Список литературы:*

1. Мамедов Э.И., Дергунова Е.С., Калмыкова Е.Н. Возможности биомедицинского применения модифицированных пектинов / Сорбционные и хроматографические процессы // Т. 21, №1, 2021. С. 77-85

2. Мамедов Э.И., Дергунова Е.С., Калмыкова Е.Н. Изучение условий фосфорилирования крахмала. Материалы I всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Тенденции развития современной науки», ЛГТУ, Липецк, 2020 г., с. 34-38.

## Лектин С-типа из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

Т.О.Мизгина<sup>1,2</sup>, И.В.Чикаловец<sup>1,2</sup>, В.И.Молчанова<sup>1</sup>, А.С.Кузьмич<sup>1</sup>,

Р.Х.Зиганшин<sup>3</sup>, О.В.Черников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова РАН, Москва

e-mail: [tanya.tasha@mail.ru](mailto:tanya.tasha@mail.ru)

Mollusca - одна из крупнейших и биоразнообразных групп в животном мире. В отсутствие адаптивного иммунитета, они полагаются исключительно на сложную врожденную иммунную систему, важная роль в которой отведена лектинам С-типа (CTL). CTL представляют собой суперсемейство белков, члены которого Ca<sup>2+</sup>-зависимым образом связываются с углеводсодержащими структурами и имеют один (и более) высоко-консервативный углевод-распознающий домен.

Ранее из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* был выделен и частично охарактеризован муцин-специфичный Ca<sup>2+</sup>-зависимый лектин (GYL). LC-MS/MS анализ триптического гидролизата лектина позволил установить аминокислотные последовательности пяти пептидных фрагментов GYL. Фрагменты не имели гомологии с известными лектинами морских беспозвоночных, однако содержали консервативные мотивы, характерные для CTL, такие как EPN (Glu-Pro-Asn) и WND (Trp-Asn-Asp), отвечающие за Ca<sup>2+</sup>-зависимое связывание с лигандом. Полученные данные позволяют отнести GYL к лектинам С-типа.

Исследование пространственной организации GYL методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) и последующий расчет содержания элементов вторичной структуры показали, что GYL является β-структурированным белком. Выраженная тонкая структура КД спектров указывает на асимметрию окружения ароматических остатков, их жесткую фиксацию в молекуле и свидетельствует о компактной третичной организации лектина.

Проведенное количественное определение синтезируемых в макрофагальных клетках активных форм кислорода (АФК) методом флуоресцентных зондов показало, что инкубирование RAW 264.7 с GYL приводит к существенному возрастанию уровня АФК в цитоплазме клеток. Подобную картину наблюдали и при инкубировании клеток с ЛПС, используемым в качестве препарата сравнения. Изучение влияния GYL на продукцию провоспалительных (ФНО-α и ИЛ-6) цитокинов выявило его значительный цитокинстимулирующий эффект.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90112

**Структурная характеристика пектинового полисахарида  
мякоти плодов баобаба *Adansonia digitata***

Патова О.А.

ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

E-mail: patova\_olga@mail.ru

Ксилогалактуронан (ХГА) обычно присутствует в качестве главного структурного элемента пектиновой макромолекулы в тканях репродуктивных органов растений. Он имеет структуру типа «елочка» и в зависимости от источника отличается степенью (молярное соотношение Xyl/GalA) и распределением замещения ксилозы вдоль главной углеводной цепи, галактуронана; длиной цепей, которые могут быть образованы одиночными остатками  $\beta$ -Xylp и / или  $\beta$ -D-ксилановыми цепями (DP 2–8); и степенью метилэтерификации.

Структурный анализ (ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, HPSEC, анализ моносахаридного состава, ЯМР-спектроскопия) показал, что главная углеводная цепь ХГА плодов баобаба в основном состоит из повторяющейся единицы  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -GalpA-1-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -GalpA-(1 $\rightarrow$ . Около 12 мол. % 1,4-связанных остатков  $\alpha$ -GalpA замещены одиночными остатками  $\beta$ -Xylp в положении O-3.

Для определения оптимальных условий выделения ХГА из мякоти плодов баобаба проведена сравнительная экстракция водой (8 ч, 50°C и 12 ч, 70°C). В результате ХГА (DM 20%, DA 2%, Mw 58 кДа, выход 23%) получен с помощью водной экстракции при 50°C. Последующее ужесточение условий экстракции путем увеличения температуры и времени привело к совместной экстракции небольших количеств компонентов крахмала и RG-I с ХГА. Сравнение наших данных с данными, полученными ранее [1], показало, что молекулярные характеристики и структура ХГА стабильны и слабо зависят от метода выделения. Отношение Xyl:GalA у ХГА колеблется от 1:4 до 1:8 и вероятно зависит от разновидности и места произрастания баобаба. По структуре пектин мякоти плодов баобаба похож на пектины из зеленых тканей *Arabidopsis thaliana* [2] и из клеточных стенок арбуза [3].

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-64-47036).

*Список литературы:*

1. Alba, K., Offiah, V., Laws, A. P., Falade, K. O., & Kontogiorgos V. Baobab polysaccharides from fruits and leaves. Food Hydrocolloids (2020). doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105874
2. Zandleven, J., Sorensen, S. O., Harholt, J., Beldman, G., Schols, H. A., Scheller, H. V., Voragen, A. J. Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry (2007). doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.016
3. Mort, A., Zheng, Y., Qiu, F., Nimtz, M., & Bell-Eunice, G. Structure of xylogalacturonan fragments from watermelon cell-wall pectin. Endopolygalacturonase can accommodate a xylosyl residue on the galacturonic acid just following the hydrolysis site. Carbohydrate Research (2008). doi.org/10.1016/j.carres.2008.03.021

## Reinforcement of alginate gels with chitin nanowhiskers

*Petrova V. A., Raik S. V., Poshina D. N., Skorik Y. A.*

*Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

*E-mail: yury\_skorik@mail.ru*

Hydrogels and composite materials based on the natural polysaccharide alginic acid (ALG) are well known and widely used in bone tissue engineering [1] and drug delivery [2]. Ionotropic ALG gels are obtained by adding charged cations, which interact with the carboxylic groups of the guluronate units of the polysaccharide molecules, whereas the mannuronate units remain free. To form ionotropic gels the mole fraction of guluronic acid in ALG should be more than 20–25% [3]. The polyanionic nature of ALG allows it to interact electrostatically with polycations to form polyelectrolyte complexes (PEC) which are attractive as a hydrogel component [4].

We designed an ALG hydrogel containing partially deacetylated chitin nanowhiskers (CNW) as filler. Composite hydrogels were produced by mixing ALG solution with aqueous suspension of CNW containing 36 % of NH<sub>2</sub> groups. CNW derived from chitin possess unique nanostructural and mechanical properties [5]. The presence of NH<sub>2</sub> groups on the crystal surface of partially deacetylated CNW provides the interaction with negatively charged carboxyl groups of ALG. That, as well as large surface area and strong hydrogen-bonding between CNW, leads to an altering of ALG hydrogel properties. The hydrogel yield stress, maximum Newtonian viscosity and relaxation time increased with an increase of CNW content. The morphology of lyophilized hydrogels (layered for ALG and honeycomb for ALG-CNW) reflected the features of the structural organization of the hydrogels. A more prolonged release of tetracycline was observed with an increased CNW content. It most likely involves the modulation of tetracycline diffusion in the matrix that can be controlled by manipulating the rheological properties of the gel through changes in the CNW content.

The resulting hydrogels were formed simply by the intermolecular interactions of the polymers used without the participation of crosslinking agents. These hydrogels may be of interest as soft gels for prolonged drug delivery.

### *Список литературы:*

1. Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang, K.H., Kim, S.K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* (2015) DOI 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008
2. Tønnesen H.H., Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2002) DOI 10.1081/DDC-120003853
3. Draget K., Bræk G.S., Smidsrød O. Alginic acid gels: The effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydrate Polymers* (1994) DOI 10.1016/0144-8617(94)90159-7
4. Sæther H.V., Holme H.K., Maurstad G., Smidsrød O., Stokke B.T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers* (2008) DOI 10.1016/j.carbpol.2008.04.048
5. Ling S., Chen W., Fan Y., Zheng K., Jin K., Yu H., Buehler M.J., Kaplan D.L. Biopolymer nanofibrils: structure, modeling, preparation, and applications. *Progress in Polymer Science* (2018) DOI 10.1016/j.progpolymsci.2018.06.004

## Неоклассика первичных клеточных стенок двудольных

*Сауткина О.В., Микшина П.В. Горшкова Т.А.*

*Казанский институт биохимии и биофизики, Казань, Россия*

*E-mail: sautkina@kibb.knc.ru*

Гибкость и эластичность первичных клеточных стенок, сочетающиеся с прочностью и жесткостью, определяются особенностями взаимоотношений полисахаридов матрикса с микрофибриллами целлюлозы. Первичные клеточные стенки механической ткани колленхимы имеют сходный с классической первичной стенкой паренхимы двудольных состав моносахаридный состав [1], но отличаются уникальной архитектурой, особенностью которой служит наличие утолщений, образованных чередующимися слоями с продольной и поперечной оси роста клеток ориентацией микрофибрилл целлюлозы, становящейся все более продольной по мере созревания стенки, и удивительной способностью расти растяжением с уже значительно утолщенными стенками [2], что в сочетании с реализацией этой тканью механической функции наталкивает на мысль о иных, по сравнению с классической первичной клеточной стенкой паренхимы, наборе полисахаридов матрикса, картине распределения, характере удерживания и роли полисахаридов в её клеточной стенке.

Объектом исследования послужит черешок листа сельдерея, в котором параллельно формируются ткани с неутолщенной (паренхима) и утолщенной (колленхима) первичной клеточной стенкой. В докладе будут сопоставлены состав и отдельные элементы структуры фракций полимеров клеточных стенок колленхимы и паренхимы, обогащенных пектинами, гемицеллюлозами и прочно удерживаемыми микрофибриллами целлюлозы полисахаридами матрикса, высвобождаемыми только после тотального разрушения микрофибрилл. При помощи комплекса биохимических подходов, включающего различные типы хроматографии, иммунно-ферментный анализ и структурную ЯМР-спектроскопию, будут выявлены ключевые игроки, отличающие клеточные стенки колленхимы и паренхимы, потенциально вовлеченные в реализацию роста растяжением колленхимы. Особое внимание будет сфокусировано на особенностях полимеров, прочно удерживаемых целлюлозой, и будет предложена гипотетическая схема их распределения в различных слоях утолщенной первичной клеточной стенки колленхимы.

### *Список литературы:*

1. *Zujovic, Z., Chen, D., Melton, L.D.* Comparison of celery (*Apium graveolens* L.) collenchyma and parenchyma cell wall polysaccharides enabled by solid-state <sup>13</sup>C NMR. Carbohydrate research (2016). DOI: 10.1016/j.carres.2015.11.006
2. *Chen, D., Melton, L. D., McGillivray, D. J., Ryan, T. M., Harris, P. J.* Changes in the orientations of cellulose microfibrils during the development of collenchyma cell walls of celery (*Apium graveolens* L.). Planta (2019). DOI: 10.1007/s00425-019-03262-8

## Разработка маркеров к генам биосинтеза крахмала картофеля *Solanum tuberosum* L.

*Сергеева Е.М., Щербань А.Б., Куваева Д.Д., Афонников Д.А., Салина Е.А., Кочетов А.В.*  
ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия  
E-mail: [sergeeva@bionet.nsc.ru](mailto:sergeeva@bionet.nsc.ru)

Крахмал – основной запасной углевод растений, является важным источником калорий в рационе питания человека, также широко применяется для ряда промышленных нужд. Одним из растений-продуцентов крахмала является картофель (*Solanum tuberosum* L.). Содержание крахмала в клубнях – важный показатель, определяющий вкусовые и технологические качества картофеля. Растущие потребности рынка требуют интенсификации процесса селекции по признаку содержания крахмала, для чего необходима разработка эффективных молекулярных маркеров.

Целью исследования является разработка ДНК-маркеров для дискриминации сортов картофеля отечественной селекции с низким, средним и высоким содержанием крахмала в клубнях. Для 17 сортов картофеля (коллекция СибНИИРС) проведен анализ содержания крахмала с использованием химического и ферментативного методов; выделены группы сортов, различающиеся по содержанию крахмала в клубнях (низкое <14%; среднее 14-16%; высокое >16%). Тестирование маркеров, ранее разработанных для других популяций картофеля [1, 2], показало отсутствие их ассоциации с содержанием крахмала у исследуемой выборки сортов. Для поиска новых генетических полиморфизмов, связанных с вариацией по содержанию крахмала у отечественных сортов картофеля, выполнено секвенирование (методами Сэнгера и Illumina) последовательностей 25 генов, участвующих в синтезе крахмала в клубнях [3] у сортов с низким (Крепыш, Невский, Жуковский ранний) и с высоким и средним содержанием крахмала (Удача, Голубизна, Гусар). Выявлены однонуклеотидные полиморфизмы, характерные для групп с низким и средне-высоким содержанием, что позволило подобрать специфичные комбинации ПЦР-праймеров для этих групп сортов.

Проведена апробация полученных комбинаций праймеров для генов *AGPL1*, *AGPL3*, *Pho1b*, *Pho2b*, *SS1*, *SS2*, *AMY3*, *SUS4*, *KT-InvInh* на выборке из 10 сортов картофеля.

Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).

### Список литературы:

1. Li L., Paulo M-J., Strahwald J. et al. Natural DNA variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield. *Theor. Appl. Genet.* 2008. V.116. P.1167–1181.
2. Li L., Tacke E., Hofferbert H-R. et al. Validation of candidate gene markers for marker-assisted selection of potato cultivars with improved tuber quality. *Theor. Appl. Genet.* 2013. V. 126. P.1039–1052.
3. Van Harsselaar J.K., Lorenz J., Senning M. et al. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Genomics.* 2017. 18:37.

**Изучение встраивания, релиза и расположения в клетках гликофинголипидов с помощью синтетических аналогов, различающихся природой липидного фрагмента**

*Сливка Е.В., Комарова В.А., Хайдуков С.В., Тузиков А.Б, Бовин Н.В., Рапопорт Е.М*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)  
E-mail: slivkaekaterina@gmail.com*

Гликолипиды вовлечены в межклеточную адгезию и передачу клеточных сигналов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что липиды способны не только связываться с сигнальными белками, но и переходить с клетки на клетку, оказываясь там, где отсутствует машинерия для их синтеза. Многие важные аспекты транспорта липидов остаются неизвестными, например, как они преодолевают слои гликокаликса, выходя из клетки-донора и попадая в клетку-акцептор. Целью данного исследования было: изучить, как структура гидрофобного фрагмента влияет на встраивание, релиз и локализацию липида в клетках. Для этого использовались биотинилированные синтетические конструкторы FSL (Function-Spacer-Lipid), содержащие карбоксиметилглицильный спейсер (CMG(2)) и липидный остаток в трех вариантах: DOPE (1,2-О-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин), холестерин (Chol), или церамид (Cer). FSL синтезированы в Лаборатории углеводов ИБХ РАН и являются аналогами природных ГЛ, сохраняя способность природных прототипов встраиваться в мембрану клетки. Показано, что: 1) все три FSL независимо от структуры липидного остатка встраиваются в плазматическую мембрану и располагаются вне рафтов; 2) FSL накапливаются в клетке в виде патчей размером 0,2 – 2 мкм (большинство патчей Chol- и DOPE-конструкторов имеют размер 0.3 мкм, Cer-конструктора – 0.6 мкм), 3) большая часть FSL с DOPE и Cer накапливаются в гликокаликсе, в то время как biot-CMG (2)-Chol – в интерфейсе между плазматической мембраной и гликокаликсом; 4) конструктор с Cer встраивается (процесс выходит на плато) в клетки в течение 1 ч, процесс встраивания FSL с Chol и DOPE – более медленный; 5) выход конструкторов с Cer и DOPE происходит быстрее, чем с Chol; 6) выход всех трех FSL-конструкторов, независимо от природы гидрофобного остатка, происходит в виде микровезикул, диаметр которых составляет в среднем 135 нм. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии липидной части на локализацию и выход из клетки использованных молекулярных проб, что дает основания ожидать аналогичные эффекты и в случае природных гликофинголипидов. (Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №20-04-00677).

## Электроформование нетканых материалов биомедицинского назначения на основе фотосшиваемых производных полисахаридов

*Соколова Н.Д.<sup>1,2</sup>, Пошина Д.Н.<sup>1</sup>, Скорик Ю.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: natashasokoloff@gmail.com*

Биосовместимость и биоразлагаемость полисахаридов обуславливает их использование в качестве материалов раневых покрытий и тканеинженерных скаффолдов. Однако их применение ограничено растворимостью в воде и низкой прочностью. Электроформование является простым и эффективным методом получения полимерных нетканых материалов, в том числе биомедицинского назначения [1]. Модификация водорастворимых полисахаридов фотосшиваемыми группами позволяет проводить электроформование из нетоксичных водных растворов, при этом получать нерастворимые и прочные нетканые материалы в результате фотосшивания [2, 3]. Цель данной работы – получение нерастворимых нетканых материалов из растворов аллилированных и метакрилированных полисахаридов методом электроформования с последующим фотосшиванием.

Аллильная и метакрилатная группы были введены в альгиновую и гиалуроновую кислоты, хитозан и хитин в количестве 5-30 мол%. Замещение подтверждено ЯМР спектроскопией. Подобран оптимальный состав прядильных растворов модифицированных полисахаридов, обеспечивающий непрерывность процесса капиллярного и бескапиллярного электроформования. Для составов определены оптимальные диапазоны вязкости, поверхностного натяжения, электропроводности. Методом АСМ показано образование однородных гладких по морфологии волокон. Низкой степени замещения было достаточно для эффективного фотосшивания сформованных волокон. После обработки УФ-излучением материалы сохраняли свою форму в физиологическом растворе в течение нескольких суток. Полученные материалы представляют интерес в качестве тканеинженерных матриц.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-29-17074).

### *Список литературы:*

1. *Poshina D., Otsuka I.* Electrospun polysaccharidic textiles for biomedical applications. *Textiles* (2021). DOI 10.3390/textiles1020007
2. *Huerta-Angeles G., Brandejsová M., Knotková K., Hermannová M., Moravcová M., Šmejkalová D., Velebný V.* Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of substitution suitable for production of water resistant nanofibers. *Carbohydrate Polymers* (2016). DOI 10.1016/j.carbpol.2015.10.077
3. *Zhou Y., Liang K., Zhang C., Li J., Yang H., Liu X., Yin X., Chen D., Xu W., Xiao P.* Photocrosslinked methacrylated chitosan-based nanofibrous scaffolds as potential skin substitute. *Cellulose* (2017). DOI 10.1007/s10570-017-1433-4

## Изучение неспецифического гидролиза хитозана под действием различных гидролаз

*Соколова Н.Д.<sup>1,2</sup>, Пошина Д.Н.<sup>1</sup>, Скорик Ю.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: [natashasokoloff@gmail.com](mailto:natashasokoloff@gmail.com)*

Ферментативный гидролиз хитозана – эффективный метод получения низкомолекулярного хитозана и хитоолигосахаридов. Низкомолекулярные фракции хитозана обладают большей биологической активностью по сравнению с высокомолекулярными фракциями, что делает их более перспективными материалами для биомедицинского применения [1]. Способность хитозана подвергаться неспецифическому гидролизу делает возможным использование более дешёвых гидролаз для получения низкомолекулярных продуктов [2].

Цель работы заключалась в определении условий ферментативного гидролиза хитозана, обеспечивающих требуемое снижение его молекулярной массы. Активность ферментов оценивали по концентрации редуцирующих сахаров по окончании гидролиза по методу с пикриновой кислотой.

Проведены реакции гидролиза хитозана в присутствии лизоцима, целлюлазы, липазы, пепсина и трипсина, а также гиалуроновой кислоты в присутствии лизоцима и целлюлазы. Эффективность ферментов при гидролизе хитозана убывает в ряду: целлюлаза > трипсин > лизоцим > липаза > пепсин. Увеличение степени деацетилирования хитозана снижает реакционную способность образцов хитозана, тогда как молекулярная масса не оказывает заметного влияния на процесс гидролиза. При гидролизе гиалуроновой кислоты целлюлаза оказалась эффективнее лизоцима. В одинаковых условиях гиалуроновая кислота хуже подвергалась гидролизу, чем хитозан с низкой степенью деацетилирования (71%), но лучше, чем почти полностью деацетилированный хитозан (97%), что свидетельствует о ключевой роли ацетамидной группы при гидролизе неспецифическими ферментами. Полученные данные могут послужить дальнейшей оптимизации процесса получения хитоолигосахаридов ферментными методами.

### *Список литературы:*

1. *Kim S., Rajapakse N.* Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* (2005). DOI 10.1016/j.carbpol.2005.08.012
2. *Poshina D.N., Raik S.V., Poshin A.N., Skorik Y.A.* Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. *Polymer Degradation and Stability* (2018). DOI 10.1016/j.polymdegradstab.2018.09.005

**Физико-химические свойства полисахаридов как фактор, определяющий скорость диффузии глюкозы из растительного материала в искусственной энтеральной среде**

Фельцингер Л.С.

*ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия*

Одно из направлений исследования растительных полисахаридов связано с выяснением механизмов их воздействия на организм. В частности, исследование регуляции аппетита растительной пищей богатой не утилизируемыми полисахаридами (НП) [1]. Показано, что НП могут влиять на аппетит, нивелируя скачки уровня глюкозы в кровиза счёт связывания глюкозы в тонком кишечнике, и тем самым замедляют её поступление в кровоток, что способствует стабилизации уровня инсулина [2, 3].

Основными и естественными источниками НП являются съедобные части растений. Поэтому на физико-химические свойства НП в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), в том числе на способность к связыванию глюкозы, будут влиять свойства клеточной стенки, модифицирующейся в ЖКТ в зависимости от вида и типа растительной ткани растения. Как гликозидные связи, так и различные нековалентные взаимодействия полисахаридов клеточной стенки могут быть чувствительны к условиям ЖКТ (секреция пищеварительных желез, ферментный гидролиз, экстремальные значения рН и присутствие солей, минеральных, желчных кислот).

В работе исследована способность растительных материалов, полученных при предварительной обработке съедобных частей плодов яблони *Malus domestica*L., нектарина *Prunus persicavar.nectarina* и сливы *Prunus domestica*L. В искусственных оральной и гастральной средах, к замедлению диффузии глюкозы в диализат при инкубировании в искусственной энтеральной среде. Установлено, что наибольшей способностью к удержанию глюкозы характеризуются растительные материалы, полученные из плодов яблони и нектарина. Исследована зависимость глюкозоудерживающей способности растительного материала от состава и физико-химических свойств (растворимость, образование вязких растворов, водоудерживающая способность, сорбционные свойства), входящих в их состав полисахаридов.

*Список литературы:*

- [1] *Brownlee I.A.* The physiological roles of dietary fiber. *Food Hydrocolloids* (2011). DOI:10.1016/j.foodhyd.2009.11.013
- [2] *Fabek H., Messerschmidt S., Brulport V., Goff H.D.* The effect of in vitro digestive processes on the viscosity of dietary fibres and their influence on glucose diffusion. *Food Hydrocolloids* (2014). DOI:10.1016/J.FOODHYD.2013.08.007
- [3] *Juvonen K.R., Purhonen A.-K., Salmenkallio-Marttila M., Lähteenmäki L., Laaksonen D.E., Herzig K.-H., et al.* Viscosity of oat bran-enriched beverages influences gastrointestinal hormonal responses in healthy humans. *Journal of Nutrition* (2009). DOI: 10.3945/jn.108.099945.

## Пространственная структура лектина из мантии мидии *Mytilus trossulus*

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

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

*Владивосток, Россия*

*E-mail: alishichka@mail.ru*

Лектин из мидии *Mytilus trossulus* (MTL) является членом нового семейства Mytilectin, в которое входят лектины, выделенные из мидий *Crenomytilus grayanus* (CGL), *Mytilus galloprovincialis* (MytiLec) и *Mytilus californianus* (MCL). Они имеют пространственную структуру, известную как «бета-трилистник» с тремя углевод-связывающими сайтами, обладают высокой степенью гомологии друг с другом по аминокислотной последовательности [1].

Для MytiLec и CGL были получены кристаллические структуры и установлено, что они представляют собой нековалентно-связанные димеры, состоящие из двух полипептидов, проявляющих Gal/GalNAc-связывающую активность на каждом субдомене. Присутствие шести связывающих участков на молекуле белка предполагает, что мультивалентность может быть функционально релевантной, т.к. MytiLec, полученный в виде мономера, не связывался с опухолевыми клетками [2]. Методом компьютерного моделирования были построены модели мономера и димера MTL. Установлено, что лектин образует гомодимер в результате взаимодействий 6 водородных связей ароматических боковых цепей с последующей стабилизацией структуры за счет гидрофобных взаимодействий 4 аминокислот. Для практического подтверждения этих результатов исследовали динамику изменения размера молекул лектина в растворе. Методами динамического рассеяния света установлено, что спустя сутки в растворе присутствуют мономеры и димеры MTL, а через двое суток наблюдаются только димеры. Полученные результаты согласуются с данными электрофореза в ПААГ, где свежеприготовленный раствор MTL присутствует в виде мономера с молекулярной массой 17 кДа, а спустя 48 часов содержит как мономер, так и димер с массами 17 и 34 кДа соответственно. Это доказывает, что MTL, как и другие представители семейства Mytilectin образует димеры, что влечет за собой увеличение аффинности к лигандам и является необходимым для проявления некоторых биологических свойств.

Работа выполнена при поддержке грата РФФИ № 19-04-00157

### *Список литературы:*

1. I. Chikalovets, A. Filshtein, V. Molchanova, T. Mizgina, P. Lukyanov, O. Nedashkovskaya, K.-Feng Hua, O. Chernikov. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties. *Molecules*. 2020. DOI: 10.3390/molecules25010150.
2. D. Terada, F. Kawai, H. Noguchi, S. Unzai, I. Hasan, Y. Fujii, S.-Y. Park, Y. Ozeki, J. R. H. Tamea. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types. *Scientific reports*. 2016. DOI: 10.1038/srep28344.

## Полисахариды слизи семян льна как функциональные ингредиенты в пищевых технологиях

*Харина М.В., Сибгатуллин Т.А., Шайхиева (Гайфуллина) И.З., Микишина П.В.*

*КИББ – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия  
E-mail: somariya@mail.ru*

На сегодня во всем мире признана взаимосвязь между характером питания и здоровьем населения, в связи с чем востребованным является создание новых продуктов с заданными характеристиками и лечебно-профилактическими свойствами. Основным лабильным и эффективным компонентом рецептур для достижения этих свойств служат различные технологические добавки и ингредиенты. Благодаря разнообразию структур, биодружественности и доступности достаточно перспективными в качестве таких добавок выступают сложные углеводы и углевод-углеводные комплексы растительного происхождения, в частности, легко экстрагируемые слизи, образуемые семенами при набухании в воде.

В этой работе проведено исследование свойств жидкой и лиофильно высушенной слизи семян льна и изучение влияния ее внесения на интенсивность процесса брожения теста и физико-химические показатели качества пшеничного и ржано-пшеничного хлеба – традиционного продукта питания человека. Исследование влияния слизи льна на количество образовавшегося и удерживаемого углекислого газа и образование теста в процессе ферментации показало, что с повышением концентрации слизи в рецептуре тесто теряет меньше углекислого газа в процессе брожения, дольше сохраняет стабильность, увеличивает высоту подъема. Внесение слизи позволяет сократить продолжительность брожения при производстве хлеба и повысить выход готового продукта. Для используемой слизи были определены антирадикальная и металлохелатирующая активности, восстановительная сила, общее содержание фенольных соединений; установлено, что ее ключевыми компонентами служат сложные углеводы – арабиноксилан и рамногалактуронан I. Экспериментально доказано, что добавление слизи семян льна позволяет получить хлеб с улучшенными физико-химическими, реологическими и органолептическими показателями, что позволяет рассматривать эту углевод-обогащенную добавку в качестве перспективного и эффективно «работающего» компонента новых рецептур одного из ключевых продуктов функционального питания человека.

## Свойства пектиновых гелей, определяющие их насыщающий эффект

*Храмова Д.С.<sup>1</sup>, Витязев Ф.В.<sup>1</sup>, Гюнтер Е.А.<sup>1</sup>, Попейко О.В.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>ФИЦ Коми научный центр Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Российская федерация  
E-mail: dkhramova@gmail.com*

Для решения проблемы избыточного веса и ожирения актуальным представляется поиск веществ с насыщающим действием. Цель работы – выявление свойств пектиновых гелей, определяющих их насыщающий эффект. Для этого методом ионотропного желирования в присутствии ионов кальция были получены гелевые микрочастицы из пектинов бадана толстолистного (BC), каллусных культур смолевки обыкновенной (SVC) и ряски малой (LMC), а также яблочного пектина AU701. Набухание (увеличение диаметра), устойчивость (сохранение формы) и водоудерживающую способность (адсорбция воды) микрочастиц анализировали в средах, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Определение насыщающего эффекта гелей проводили на мышах альбиносах ( $n=70$ ), которым перорально вводили микрочастицы (400 мг/кг, 600 мкл/мышь), измеряя количество съеденного корма в течение 2, 5 и 21 ч после введения гелей. Контрольные животные получали эквивалентный объем воды.

Показано, что гели из пектинов SVC и LMC набухают в кислых условиях желудка в большей степени, чем гель из пектина AU701, а водоудерживающая способность микрочастиц из пектина BC выше, чем в контрольных образцах ( $p<0.05$ ). Наибольшая устойчивость гелей в условиях ЖКТ показана для микрочастиц из пектина SVC. Оказалось, что эти же микрочастицы обладают максимальным насыщающим эффектом. Они снижают потребление пищи лабораторными мышами на 32%, насыщающий эффект при этом длится в течение 21 ч, тогда как эффект микрочастиц из пектинов LMC и BC оказывается менее длительным (5 ч) ( $p<0.05$ ). Микрочастицы из пектина AU701 не влияют на потребление пищи лабораторными мышами. Таким образом, увеличение способности пектинового геля набухать и удерживать воду в среде желудка представляет собой перспективную стратегию повышения эффективности функциональных пищевых ингредиентов, регулирующих аппетит. Однако максимальным насыщающим эффектом обладают пектиновые гели, способные не только набухать в желудке, но и сохранять гелевую структуру в процессе пищеварения.

**Противоопухолевый потенциал лектинов морских беспозвоночных**  
*Черников О.В.<sup>1</sup>, Кузьмич А.С.<sup>1</sup>, Молчанова В.И.<sup>1</sup>, Мизгина Т.О.<sup>1</sup>, Фильштейн А.П.<sup>1</sup>,  
Чикаловец И.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия  
E-mail: chernikov@piboc.dvo.ru

Углевод-белковое взаимодействие рассматривается как один из наиболее важных механизмов передачи биологической информации на уровне клетки. Лектины, как углевод-связывающие белки, могут быть использованы для расшифровки гликокода, определяющегося составом олигосахаридов в гликоконъюгатах. Биологическая активность лектинов, обусловленная связыванием с гликоконъюгатами, экспрессированными на клеточной поверхности, может приводить не только к изменению структуры и свойств клеток, но даже к их гибели.

При исследовании методом микроанализа на гликочипах углеводной специфичности лектинов из мидий *Crenomytilus graynus* (CGL) и *Mytilus trossulus* (MTL) выявлено, что белки способны связывать как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -аномеры галактозы (Gal), но связывание CGL с концевой  $\alpha$ -Gal более сильное, чем MTL.

Это различие приводит к тому, что лектины по-разному влияют на опухолевые клетки. CGL лучше MTL агглютинирует клетки Raji лимфомы Беркитта, на поверхности которых присутствует много терминальных остатков  $\alpha$ -Gal. Согласно результатам получились при исследовании антипролиферативного действия лектинов MTS-методом на клетки лимфомы Беркитта (линии Raji, EB-1 и Daudi). Концентрация полумаксимального ингибирования пролиферации опухолевых клеток достигалась только в присутствии CGL. В свою очередь MTL оказывал антипролиферативное действие в меньшей степени. Исследован эффект лектинов на клеточный цикл и апоптоз клеток Raji методом проточной цитофлуориметрии. Влияние MTL на прогрессию клеточного цикла и индукцию апоптоза наблюдается при более высоких концентрациях, по сравнению с CGL. С помощью метода мягкого агара исследовали действие лектинов на самопроизвольное формирование и рост колоний опухолевых клеток человека HT-29 (аденокарциномы толстой кишки) и MCF-7 (аденокарциномы молочной железы). CGL значительно ингибировал самопроизвольное образование и рост колоний опухолевых клеток, MTL – в гораздо меньшей степени.

Механизм действия лектинов не опосредован активными формами кислорода, а заключается в повреждении митохондрий и блокировке ключевых точек клеточного цикла опухолевых клеток.

Методами компьютерного моделирования показано, что различная активность CGL и MTL в отношении опухолевых клеток может быть обусловлена величиной энергии связывания этих лектинов с углеводными лигандами на поверхности клеток, поскольку молекулярное узнавание остатков терминальных углеводов на поверхности опухолевых клеток является ключевым моментом для проявления биологического действия лектинов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта

## Новые таксоны в базе данных по гликозилтрансферазам

*А.И. Ширковская*

*ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва,*

*Ленинский пр-т 47,*

*E-mail: shirkovskaya.a@bf-logistic.ru*

Гликозилтрансферазы – ферменты, переносящие сахарный остаток от активированного моносахарида на нуклеофильный акцептор – важнейший объект гликобиологии. Хотя существуют большие базы данных по активности гликозилтрансфераз, предсказанной методами биоинформатики, только малая часть этих данных проверена и подтверждена экспериментально. При этом, структурированные и экспериментально подтвержденные данные по биохимическим функциям гликозилтрансфераз - чрезвычайно востребованы в биотехнологии и фармацевтике.

Мы представляем регулярно расширяемую базу данных по гликозилтрансферазам (CSDB\_GT), созданную на платформе гликоинформатики CSDB (Carbohydrate Structure Database). На сегодня она содержит систематизированные данные по экспериментально подтвержденным активностям гликозилтрансфераз наиболее изученных представителей бактерий, грибов и растений - *E.coli*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* соответственно [1, 2, 3]. Целью проекта является полное покрытие по функциям гликозилтрансфераз выбранных организмов, а также их биологического предназначения, библиографических и прочих данных.

На данный момент ведутся работы по расширению базы данных гликозилтрансферазами особо вирулентных и мультирезистентных бактерий, вызывающих внутрибольничные инфекции и известных под акронимом ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter* spp.).

Работа выполнена при поддержке РФФ 18-14-00098-П.

### *Список литературы:*

1. *K.S Egorova, Ph.V. Toukach. CSDB\_GT: a new curated database on glycosyltransferases. Glycobiology (2017). DOI 10.1093/glycob/cww137*
2. *K.S Egorova, Yu.A. Knirel, Ph.V. Toukach. Expanding CSDB\_GT glycosyltransferase database with Escherichia coli. Glycobiology (2019). DOI 10.1093/glycob/cwz006*
3. *K.S Egorova, N.S. Smirnova, Ph.V. Toukach. CSDB\_GT, a curated glycosyltransferase database with close-to-full coverage on three most studied non-animal species. Glycobiology (2021). DOI 10.1093/glycob/cwaa107*

## Методы и результаты предсказаний сайтов гликозилирования белков прокариотов на примере флагеллинов

Щеголев С.Ю.<sup>1</sup>, Бурьгин Г.Л.<sup>1</sup>, Красова Ю.В.<sup>1</sup>, Пятибратов М.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук, Саратов, Россия

<sup>2</sup>Институт белка Российской академии наук, Пущино, Россия  
E-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

Гликозилирование белков является важнейшей их посттрансляционной модификацией, обеспечивающей функциональность и повышенную стабильность гликопротеинов.

Целью работы были оценки эффективности биоинформатических методов предсказания мест присоединения углеводов при гликозилировании белков [1-3] на примере флагеллинов альфа-протеобактерий *Azospirillum brasilense* Sp7, *Niveispirillum irakense* DSM 11586, представляющих интерес в исследованиях растительно-микробных взаимодействий, и археллинов галофильной археи *Halobacterium salinarum* NRC-1, используемых в генно-инженерных работах с целью создания наноматериалов с заданными свойствами.

Надежность предсказаний [1-3] оценивали с учетом результатов моделирования 2D- и 3D-структур белков методами [4, 5].

Сопоставление предсказаний [3], специализированных для прокариотических белков, с результатами молекулярного моделирования их структуры [4, 5] показало, что наиболее вероятными местами связывания углеводов при O-гликозилировании флагеллинов можно считать остатки T269, T275, T278, T282 (*A. brasilense* Sp7); S102, S103, S106, T265, T269, S270, T271, S275, T353, S355, S358 (*N. irakense* DSM 11586). Указанные остатки расположены в 3D-структуре белков в элементах их 2D-структуры, достаточно открытых для взаимодействий с бактериальными гликозилтрансферазами и олигосахарилтрансферазами [3].

Аналогичные оценки для штамма *H. salinarum* NRC-1 привели к предсказаниям мест связывания углеводов при N-гликозилировании пяти его археллинов, в частности, для варианта A1 – N72, N85, N113 (нумерация остатков без лидерного пептида). Наличие этих сайтов подтверждается литературными данными с результатами экспериментальных исследований. Отметим, что все три независимых метода [1-3] в случае археи дали одни и те же предсказания, хотя методы [1, 2] были разработаны исключительно на эукариотических обучающих данных. Это можно связать с эволюционной близостью белковых систем эукариотов и архей, обсуждаемой в ряде современных публикаций.

### Список литературы:

1. Wang D., Liu D., Yuchi J., He F., Jiang Y., Cai S., Li J., Xu D. MusiteDeep: a deep-learning based webserver for protein post-translational modification site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research* (2020). DOI 10.1093/nar/gkaa275.
2. Gupta R., Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* (2002). Vol. 9. P. 310-322. PMID: 11928486.

3. *Chauhan J.S., Bhat A.H., Raghava G.P.S., Rao A.* GlycoPP: A webserver for prediction of N- and O-glycosites in prokaryotic protein sequences. PLOS ONE (2012). DOI 10.1371/journal.pone.0040155.
4. *Wang S., Li W., Liu S., Xu J.* RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. Nucleic Acids Research (2016). DOI 10.1093/nar/gkw306.
5. *Zheng W., Zhang C., Li Y., Pearce R., Bell E.W., Zhang Y.* Folding non-homology proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. Cell Reports Methods (2021). DOI 10.1016/j.crmeth.2021.100014.

## Глюкозотолерантная бета-глюкозидаза 5 семейства гликозидгидролаз из *Scytalidium candidum* 3С: свойства и кристаллизация.

Энейская Е.В.<sup>1</sup>, Корбан С.А.<sup>1</sup>, Швецова С.В.<sup>1,2</sup>, Бобров К.С.<sup>1,3</sup>, Кульминская А.А.<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская область, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> «Курчатовский геномный центр – ПИЯФ», Гатчина, Ленинградская область, Россия

Бета-глюкозидазы, одни из ключевых ферментов гемицеллюлазного комплекса, катализируют реакцию гидролиза концевой бета-глюкозы с невозстанавливающего конца различных гликоконъюгатов. Наибольшее число охарактеризованных ферментов относятся к первому семейству гликозидгидролаз (GH1), при этом пространственные структуры широко исследованы для представителей семейств GH1 и GH3 [1].

Ранее было показано, что мицелиальный гриб *Scytalidium candidum* 3С (бывш. *Geotrichum candidum* 3С) является продуцентом гемицеллюлазного комплекса ферментов, в том числе бета-глюкозидаз [2-4].

В ходе настоящей работы фермент бета-глюкозидаза из *S. candidum* 3С был очищен до гомогенного состояния. Молекулярная масса очищенного фермента составила  $38 \pm 5$  кДа. На основании филогенетического анализа аминокислотной последовательности фермент был отнесён к семейству GH5, подсемейству 9.

Была определена зависимость активности и стабильности бета-глюкозидазы от pH среды и температуры. Определены кинетические параметры реакции гидролиза пара-нитрофенил глюкозида, катализируемой исследуемым ферментом:  $k_{cat}=55.3 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_m = 2.6 \text{ mM}$ ,  $K_i$  глюкозой = 597 mM. Показано, что фермент катализирует реакцию трансгликозилирования. Проведён предварительный скрининг условий кристаллизации фермента с использованием коммерческого набора реактивов (Hampton Research, США).

### Список литературы:

1. Godse, R., Bawane, H., Tripathi, J., & Kulkarni, R. (2021). Unconventional  $\beta$ -Glucosidases: A Promising Biocatalyst for Industrial Biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
2. Родионова Н.А. и др. (1984). Целлюлолитические ферменты *Geotrichum candidum*. Микробиология, 53, 237–241.
3. Borisova, A.S. et al. (2015). Sequencing, biochemical characterization, crystal structure and molecular dynamics of cellobiohydrolase Cel7A from *Geotrichum candidum* 3С. *The FEBS Journal*, 282(23), 4515–4537.
4. Павлов, И.Ю. и др. (2018). Комплексный анализ углеводов-активных ферментов мицелиального гриба *Scytalidium candidum* 3С. *Биохимия*, 83(11), 1722–1735.