

1st Far-Eastern International Symposium on Life Sciences

2008

Vladivostok,  
September, 2-7



**МОЛОДЕЖНАЯ СЕКЦИЯ**

«Актуальные проблемы химии и биологии»

Конкурс "У.М.Н.И.К."

**МАТЕРИАЛЫ**

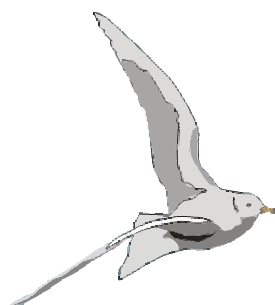


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДВО РАН  
ИНСТИТУТ КАТАЛИЗА ИМ. Г.К. БОРЕСКОВА СО РАН

**1st Far-Eastern International Symposium  
on Life Sciences**

**МОЛОДЕЖНАЯ СЕКЦИЯ  
«Актуальные проблемы химии и биологии»**



**МАТЕРИАЛЫ**

**Часть II  
Конкурс «У.М.Н.И.К.»**

**Владивосток - 2008**

УДК 54

Материалы молодежной секции «Актуальные проблемы химии и биологии», 1st Far-Eastern International Symposium on Life Sciences, Часть II, Конкурс «У.М.Н.И.К.», Владивосток, 2-7 сентября 2008 г. – с. 48.

*Программный комитет симпозиума:*

академик Стоник В.А., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток (председатель)  
академик Пармон В.Н., ИК СО РАН, Новосибирск  
член-корр. РАН Васьковский В.Е., ТИБОХ ДВО РАН, ДВГУ, Владивосток  
д.х.н. Соловьева Т.Ф., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток  
к.х.н. Красикова И.Н., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток

*Организационный комитет симпозиума:*

академик Стоник В.А., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток (председатель)  
член-корр. РАН Васьковский В.Е., ТИБОХ ДВО РАН, ДВГУ, Владивосток  
д.б.н., Каленик Т.К., ИПТ ДВГЭУ, Владивосток  
к.х.н. Красикова И.Н., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток  
к.б.н. Кусайкин М.И., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток  
к.б.н. Калинин В.И., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток  
к.х.н. Ведягин А.А., ИК СО РАН, Новосибирск  
к.х.н. Матвеев А.В., ИК СО РАН, Новосибирск  
Шепетова Н.М., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток  
Губарь А.В., ИК СО РАН, Новосибирск

*Секретариат симпозиума:*

к.б.н. Бурцева Ю.В., ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток

© ТИБОХ ДВО РАН

© ИК СО РАН

## СОДЕРЖАНИЕ

### ПРОЕКТЫ УЧАСТНИКОВ КОНКУРСА «У.М.Н.И.К.»

<b>Барабанова Анна Олеговна</b> <i>Каррагинаны - сульфатированные полисахариды - потенциальная основа для создания лекарственных препаратов и пищевых добавок</i>	<b>5</b>
<b>Борода Андрей Викторович</b> <i>Исследование криоустойчивости морских гидробионтов и создание криобанка морских организмов</i>	<b>10</b>
<b>Голохваст Кирилл Сергеевич</b> <i>Исследование биологической активности цеолитов месторождений Дальнего Востока <i>in vitro</i></i>	<b>15</b>
<b>Дышловой Сергей Анатольевич</b> <i>Создание биологически-активной добавки с канцерпревентивными свойствами на основе ааптамина</i>	<b>22</b>
<b>Жидков Максим Евгеньевич</b> <i>Моделирование, синтез и биотестирование некоторых производных и аналогов морского алкалоида фаскаплизина</i>	<b>25</b>
<b>Захаренко Александр Михайлович</b> <i>Разработка и создание нового поколения лекарственных средств и/или биологически активных добавок на основе веществ с установленной химической структурой</i>	<b>31</b>
<b>Никонов Антон Олегович</b> <i>Экстракция редких металлов из карьерных вод отработанных месторождений ацилированными полиэтилен полиаминами</i>	<b>35</b>
<b>Савина Александра Сергеевна</b> <i>Создание лаборатории, осуществляющей комплексные биоиспытания веществ и препаратов на присутствие различных видов противоопухолевой активности</i>	<b>40</b>
<b>Сидорова Ольга Вениаминовна</b> <i>Биотехнологическое получение бактериального белка - порина <i>Yersinia pseudotuberculosis</i></i>	<b>44</b>

## Конкурс «УМНИК»

Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям и Федерального агентства по образованию объявляет о реализации очередного цикла Программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК») на 2008 год.

Целью Программы\* «УМНИК» является выявление молодежи, стремящейся к самореализации через инновационную деятельность, и стимулирование массового участия молодежи в научно-технической и инновационной деятельности путем организационной и финансовой поддержки инновационных проектов такой молодежи.

Мы рады сообщить, что в рамках международного симпозиума «**1st Far-Eastern International Symposium on Life Sciences**», для проведения конкурса «УМНИК» организована отдельная секция.

Участники конкурса «УМНИК» - физические лица, работающие в области химии и биохимии, в возрасте до 28 лет включительно.

Объем финансирования инновационного проекта – 200 000 рублей в год.

Продолжительность финансирования – 2 года.

Количество победителей будет определяться уровнем поданных заявок.

# **КАРРАГИНАНЫ - СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ - ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК**

Барабанова Анна Олеговна

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН*

*690022, Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, д. 159*

*e-mail: anuta@piboc.dvo.ru*

## **Краткая аннотация**

Красные водоросли, которыми богаты моря Дальнего Востока, содержат в значительных количествах сульфатированные полисахариды – каррагинаны, уникальные по физико-химическим свойствам, структурному разнообразию и широкому спектру биологической активности. Данный проект предусматривает изучение связи структурных особенностей, молекулярно-массовых характеристик каррагинанов с их физиологической активностью. Для достижения поставленной цели планируется выделить и охарактеризовать каррагинаны из водорослей семейств *Tichocarpaceae*, *Gigartinaceae*, *Furcellariaceae* и *Phyllophoraceae*. Для установления строения новых типов каррагинанов, включая особенности гибридных структур, будут использованы современные спектральные методы, а также химическая модификация выделенных полисахаридов и использование специфических ферментов. Физико-химические свойства будут изучены методами седиментации и вискозиметрии, атомно-силовой и электронной микроскопией, а так же квазиэластического светорассеяния. Для определения биологической активности полисахаридов и отбора наиболее перспективных соединений будут проведены биоиспытания, как на клеточных культурах, так и на экспериментальных животных.

Предлагаемый проект направлен на решение фундаментальной научной проблемы, рассматривающей взаимосвязь между структурой биополимеров и их биологическими свойствами, что может быть основой для создания новых лекарственных препаратов медицинского назначения.

## **Введение**

Анализ научной и патентной литературы свидетельствует о возрастающем за последние годы интересе различных исследовательских коллективов к сульфатированным полисахаридам красных водорослей - каррагинанам. Согласно

литературным данным научные организации, включая университеты и академические институты, а также крупные международные фармацевтические компании, проявляют интерес к проблемам использования каррагинанов в медицине и фармацевтике, в качестве перспективных препаратов, обладающих широким спектром физиологической активности. Эти работы выполняются в целом ряде стран, но особенно интенсивно соответствующие исследования и разработки проводятся в Японии, США, Великобритании и Франции. Особый интерес вызывает создание лекарственных средств, с участием каррагинана, который за счет физико-химических свойств обеспечивает пролонгированное поддержание необходимой концентрации (эффекторного) действующего вещества и улучшает биодоступность лекарственного препарата. Высокая антивирусная активность различных структурных типов каррагинана широко используется при создании гелевых композиций, с ярко выраженной противомикробной направленностью. Следует подчеркнуть, что эти работы выполняются в основном на известных структурных типах каррагинанов, выпускаемых такими компаниями как Sigma (США) и Kelco (Дания). Однако до сих пор не установлено, какие конкретные структурные особенности каррагинанов отвечают за проявление той или иной биологической активности. Для каррагинанов характерно большое структурное разнообразие, которое во многом определяется видовой принадлежностью водоросли, стадией ее развития, а так же условиями произрастания макрофитов. К основным источникам каррагинанов на Дальнем Востоке можно отнести водоросли семейств Gigarinaceae и Phylorhogaceae, а также эндемические водоросли семейства Tichosagraceae, из которых был выделен новый структурный тип каррагинана.

### **Характеристика проекта**

Поиск и выделение природных соединений, а также создание на их основе препаратов, обладающих широким спектром биологической активности, является одной из наиболее перспективных задач современной биоорганической химии и медицины. Перспективными соединениями в этом направлении являются сульфатированные полисахариды - каррагинаны, проявляющие разнообразную физиологическую активность и которые широко используются во многих областях пищевой промышленности, благодаря уникальной способности образовывать вязкие растворы и прочные гели. Физико-химические и биологические свойства каррагинанов находятся в тесной зависимости от их структуры, которая характеризуется большим разнообразием. Эти полисахариды состоят из

повторяющихся дисахаридных звеньев, содержащих сульфатированные остатки D-галактозы и 3,6-ангидро-D-галактозы. К настоящему времени установлено около 20, так называемых, идеализированных типов каррагинана, различающихся содержанием 3,6-ангидро-D-галактозы, местоположением и количеством сульфатных групп.

Структура каррагинанов зависит от не только вида водоросли, но и места ее обитания и стадии развития. Так, нами были изучены физико-химические свойства каррагинанов из *T. crinitus* и показано, что рост биомассы вегетативной водоросли *T. crinitus*, а также количественный и качественный полисахаридный состав значительно зависят от условий ее обитания, таких как температура воды и интенсивность падающего света. Проведен сравнительный анализ полисахаридов, выделенных из водорослей *T. crinitus* (Tichocarpaceae) и *Chondrus pinnulatus* (Gigartinaceae), собранных на двух стадиях их развития - вегетативной и репродуктивной. Показано, что желирующие каррагинаны из обеих форм *T. crinitus* и *C. pinnulatus* имеют структуры  $\kappa/\beta$ - и  $\kappa/\gamma$ -каррагинанов, соответственно. Соотношение звеньев  $\kappa/\beta$ - и  $\kappa/\gamma$  в каррагинанах зависит от стадии развития водоросли. Имеют ли эти полисахариды блочную структуру или являются смесью нескольких типов каррагинанов, предстоит выяснить с помощью специфических ферментов - каррагиназ. Установлена структура нежелирующего полисахарида, выделенного из *T. crinitus*. Показано, что в основе его структуры лежит повторяющееся дисахаридное звено, состоящее из 3-в-D-галактопиранозид-2,4-дисульфата и 1,4-связанного 3,6-ангидро- $\beta$ -D-галактопиранозид. Это структура установлена впервые и была отнесена к новому типу полисахаридов, обозначенного как  $\chi$ -каррагинан.

В последние годы особый интерес исследователей вызывает изучение антивирусной активности сульфатированных полисахаридов, в частности способность ингибировать развитие вируса иммунодефицита человека. Обнаружено, что в условиях *in vitro*  $\gamma$ -каррагинан способен блокировать эпителиальную трансмиссию ВИЧ в дозах, в тысячу раз более низких, чем требуется для ингибирования клеточной адгезии; и на этом основании за рубежом начаты работы по созданию вагинального антисептического препарата для профилактики заражения вирусом иммунодефицита человека. Показано, что противовирусная активность таких сульфатированных полисахаридов, как каррагинаны повышается с увеличением молекулярной массы и степени сульфатирования, но при этом важную



роль играют распределение сульфатных групп, конформационная гибкость и относительное количество 3,6-ангидрогалактозы.

Кроме того, каррагинаны обладают ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами. Рядом исследователей было показано, что каррагинан *in vivo* влияет на продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерлейкин-6 и фактора некроза опухолей, и является индуктором интерферона - важного неспецифического фактора защиты организма от инфекции. Каррагинаны в зависимости от структуры и используемой концентрации способны оказывать как иммуностимулирующий, так и иммуносупрессорный эффекты.

Биологическая активность каррагинанов до конца не изучена. Приведенные литературные данные по той, или иной активности каррагинанов часто не однозначны и порой противоречивы. Противоречивость данных о фармакологическом действии этого полисахарида в первую очередь может быть обусловлена некорректным сравнением результатов, полученных в различных экспериментальных условиях, на разных типах каррагинанов. Определенную неясность в трактовку его биологической активности вносит тот факт, что препараты каррагинана давно нашли применение в экспериментальной фармакологии как индукторы воспалительной реакции: плеврита, тромбоза, микрососудистых повреждений и воспалительных заболеваний кишечника. При этом очень важен способ введения полисахарида, используемый тип каррагинана и его доза. Следует подчеркнуть, что каррагинан по-прежнему относится к нетоксичным, биосовместимым веществам и внесен в список пищевых и медицинских продуктов экспертами комиссии ВОЗ.

Впервые на модели вируса табачной мозаики (ВТМ) нами была изучена противовирусная активность различных типов каррагинанов, выделенных из красных водорослей семейств Gigartinaceae и Tichocarpaceae. Согласно полученным результатам, наибольшую активность проявляют желирующие типы – к-каррагинаны и их гибриды – к/в и к/й каррагинаны. При исследовании антикоагулирующей активности было показано, что высоким эффектом при низкой концентрации обладает к/й-каррагинан, имеющий наибольшую молекулярную массу (420 кДа). В то же время высокой макрофаг-фосфатазной активностью обладают нежелирующие типы каррагинанов. Как показывают наши результаты, присутствие сульфатных групп является обязательным, но не единственным условием для проявления биологической активности каррагинанов. Можно предположить, что определенную роль в проявлении биологической активности играют как макромолекулярная

структура каррагинана, которая, как известно, определяется его типом, так и молекулярная масса полисахарида. В связи с этим нами начато изучение биологической активности низкомолекулярных каррагинанов.

Иммуностимулирующая активность каррагинанов, как было установлено нами, также определяется их структурой. Согласно полученным данным л-каррагинан индуцирует апоптоз клетки и может обладать селективным противоопухолевым действием. Нами были получены предварительные результаты о повышении резистентности организма к токсическому действию бактериального эндотоксина (липополисахарида - ЛПС) на фоне введения каррагинана. Является ли этот эффект результатом иммуномодулирующего действия каррагинана или он связан с неспецифическим взаимодействием сульфатированного полисахарида с бактериальным эндотоксином (липополисахарида) предстоит выяснить.

Получение отдельных образцов каррагинанов с установленной структурой, с разной степенью сульфатирования и молекулярной массой, изучение механизма их действия на клетки, с целью выбора наиболее подходящих образцов, представляется важной задачей. Изучение физико-химических свойств каррагинана и связи его химического строения с физиологической активностью позволит создать препараты с заданными свойствами. Фармакологические испытания каррагинана расширят область его применения в медицинской практике и, полученная в результате информация может явиться основой для разработки новых медицинских и профилактических препаратов на основе каррагинанов

Практическое значение данного исследования заключается в оценке возможности использования каррагинанов в качестве основы лекарственных препаратов с заданными фармакологическими свойствами.

### **Ожидаемые результаты научного исследования**

Будет проведен полный анализ полисахаридов на современном методологическом уровне с привлечением широкого арсенала физико-химических методов, включая ЯМР- и ИК-спектроскопию, седиментационный анализ, вискозиметрию, ВЖХ. Будет уточнена гибридная структура желирующих каррагинанов, выделенных из водорослей семейств *Tichocarpaceae*, *Gigartinaceae* и *Furcellariaceae*. Будет проведено сравнительное изучение физико-химических свойств и физиологической активности каррагинанов, полученных химической и ферментативной деполимеризацией. Будет изучено молекулярно-массовое распределение полисахаридов, вязкость растворов, макромолекулярная организация

и определены молекулярные массы. На моделях *in vitro* и *in vivo* будут изучены биологические свойства каррагинанов, в частности противовирусная и иммуностимулирующая активности, способность влиять на синтез таких цитокинов как интерлейкин-1, интерлейкин-8 и фактор некроза опухоли

На экспериментальных животных будет изучено влияние каррагинанов на токсическое действие эндотоксинов грамотрицательных бактерий и влияние структурных особенностей каррагинанов на макроорганизм при ЛПС-индуцированной эндотоксемии. Для оценки иммуномодулирующего действия каррагинанов будет определен его эффект на лизосомальную активность перитональных макрофагов мышей и активных форм кислорода иммуннокомпетентных клеток.

Ожидаемые в рамках проекта результаты будут на уровне, сопоставимом с мировым. В качестве предпосылок выступают разнообразные виды промысловых запасов красных водорослей, находящиеся в непосредственной близости с исполнителями проекта, непосредственно в дальневосточных морях, и использование современных методов исследования биологически-активных соединений.

## **ИССЛЕДОВАНИЕ КРИОУСТОЙЧИВОСТИ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ И СОЗДАНИЕ КРИБАНКА МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ**

Борода Андрей Викторович, Одинцова Н.А., Костецкий Э.Я.

*Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,*

*г. Владивосток, ул. Пальчевского 17*

*e-mail: avboroda@yandex.ru*

### **Краткая аннотация**

Проект направлен на разработку условий криоконсервации морских гидробионтов при сверхнизких температурах и создание новых криопротекторов. Среди многих факторов, ответственных за повреждение клеток при холодовом шоке, нарушение целостности клеточных мембран и генерация свободных радикалов являются основными. Особый жирнокислотный состав клеточных мембран морских животных и растений, в которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты, значительно влияет на криоустойчивость клеток этих объектов. Задача проекта –

повышение степени сохранности и функциональной активности клеток морских беспозвоночных после замораживания-оттаивания за счет сохранения стабильности их клеточных мембран. Мы планируем провести скрининг термотропного поведения липидных экстрактов морских гидробионтов, оценить липидный состав мембран клеток до и после замораживания, провести тестирование криопротекторных свойств экзогенных липидов морских гидробионтов в комплексе с мембранными стабилизаторами и антиоксидантами. Мы предполагаем, что за счет синергизма действия этих компонентов удастся значительно снизить потери биологической активности клеток морских беспозвоночных после замораживания-оттаивания и создать криопротекторы нового типа.

### **Введение**

Проект направлен на поиск новых криопротекторов для морских гидробионтов и разработку условий их криоконсервации при сверхнизких температурах. Актуальность развития данного направления связана с необходимостью сохранения генофонда промысловых, редких и исчезающих видов морских беспозвоночных. Проблемы сохранения биоразнообразия водных организмов выдвинулись на первый план из-за большей уязвимости водных экосистем и большей, чем на наземные территории, антропогенной нагрузки на акватории.

Биологический материал при температуре жидкого азота может храниться десятилетиями, но основные разрушения клеток происходят при замораживании и оттаивании. Среди многих факторов, ответственных за повреждение клеток при холодовом шоке, нарушение целостности клеточных мембран и генерация свободных радикалов являются основными. Морские беспозвоночные являются пойкилотермными животными, а их тепловая акклиматизация происходит в достаточно широком диапазоне температур. Они не способны быстро менять вязкость липидного матрикса мембран при резких изменениях температуры. Особый жирнокислотный состав клеточных мембран морских животных и растений, в которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты (Sanina et al., 2004), значительно влияет на криоустойчивость их клеток. Обычные криопротекторы, используемые при замораживании клеток млекопитающих, являются неэффективными для данных объектов. Основой для поиска новых криопротекторов послужили работы, выполненные по исследованию фазовых переходов липидов у ряда морских беспозвоночных (Sanina, Kostetsky, 2002). Из этих работ следует, что экзогенные липиды могут быть использованы при криоконсервации клеток, так как

их фазовые переходы кристалл-жидкий кристалл лежат в области отрицательных температур (от  $-50$  до  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Именно липиды в жидко-кристаллическом состоянии способны восстанавливать области разрушения или препятствовать повреждению мембраны во время замораживания-оттаивания (Watson, 1981).

Развитие данного направления позволит прояснить механизм криоустойчивости клеток морских беспозвоночных, что станет основой для создания современного низкотемпературного генетического банка (Криобанка) половых продуктов, эмбрионов, личинок и клеток этих животных.

### **Характеристика проекта**

Задача проекта – повышение степени сохранности клеток морских беспозвоночных без нарушения их функциональной активности после замораживания-оттаивания, за счет сохранения целостности и стабильности их клеточных мембран.

Для решения поставленной задачи планируется использовать биохимические методы выделения, очистки и идентификации липидных экстрактов, молекулярно-биологические и цитологические методы анализа состояния клеточных популяций, радиоизотопные методы для оценки синтеза ДНК и РНК. Идентификация типов клеток и контроль состояния эмбрионов и личинок будут проведены с помощью световой микроскопии, иммунохимических и флуоресцентных методов. Объектами исследования будут эмбрионы, личинки, половые и эмбриональные клетки иглокожих и моллюсков. Использование в наших экспериментах в качестве модельных систем не только целых эмбрионов и личинок, но и клеток, позволяет быстро и количественно оценивать эффект различных криопротекторов на целостность и функциональную активность клеток. Выбор именно эмбриональных клеток, как более чувствительных к любым повреждающим воздействиям, а не клеток соматических тканей, намного повышает уровень ответа. Сочетание биофизических, биохимических, цитологических и молекулярно-биологических методов исследования позволит дать объективную оценку состояния клеток и личинок после замораживания.

В ходе выполнения проекта РФФИ (07-04-00367), грантов ДВО РАН (06-III-A-06-166; НТ-08-016-04) и гранта «Университеты России» (07.01.056) были предложены подходы к проблеме сохранения целостности клеточных мембран морских беспозвоночных в процессе криоконсервации. Нами разработаны методы количественной оценки биоповреждений в результате холодового шока, получены

базовые параметры для самого процесса замораживания морских животных, определены основные условия криоконсервации для эмбрионов и личинок некоторых типов морских беспозвоночных.

Мы установили, что добавление липидных экстрактов из тканей гидробионтов как в комплексе с основными криопротекторами (ДМСО), так и без них может способствовать сохранению целостности клеточных мембран морских беспозвоночных. Впервые показано, что липидные экстракты некоторых морских гидробионтов, для которых характерно большое количество липидов с ненасыщенными жирными кислотами (в частности липидные экстракты мидии и зеленой водоросли ульвы), обладают эффективными криопротекторными свойствами (Odintsova et al., 2001). Введение в криопротекторную смесь липидных экстрактов в виде эмульсии способствует восстановлению поврежденных мембран после холодового шока, обеспечивая тем самым достижение заявленного результата – повышение степени сохранности эмбриональных клеток без нарушения их функциональной активности.

Мы установили, что важнейшим компонентом криопротекторной смеси являются антиоксиданты. Начата работа по анализу факторов, вовлеченных в стабилизацию криопротекторных смесей. Проведенные исследования показали, что используемые нами режимы замораживания и криопротекторные смеси позволяют получать до 35-40% жизнеспособных эмбриональных клеток морских беспозвоночных в отличие от 5-15% при использовании традиционных криопротекторов.

Наша группа имеет основное оборудование, необходимое для данных исследований: специализированное помещение, оборудованное боксами с ламинарами, термостатами, климатической камерой, световыми микроскопами. Налажено получение стерильных сред. Для биохимической работы есть парк центрифуг, ультразвуковой диспергатор, холодильное и оптическое оборудование, дьюары для хранения жидкого азота. На биологической станции работает водолазная группа, обеспечивающая регулярный отлов животных. В 2007 году в Институт биологии моря поступило новое оборудование, необходимое для успешной работы Криобанка: программный замораживатель, низкотемпературный фризер, криостат, современные дьюары для хранения биологического материала.

Общий план работы включает следующие этапы:

- 1) оптимизация режимов криоконсервации для отдельных видов морских беспозвоночных;

2) анализ криопротекторных свойств липидных экстрактов морских гидробионтов, антиоксидантов и некоторых углеводов, как возможных мембранных стабилизаторов;

3) исследование кумулятивного действия различных компонентов криопротекторных смесей при замораживании-оттаивании половых продуктов, эмбрионов, личинок и клеток морских беспозвоночных;

4) оценка липидного состава мембран клеток до и после замораживания.

### **Прогнозируемый результат проекта**

Будет разработан состав новых криопротекторов, и предложены условия для криосохранения генетических ресурсов морских организмов. Это поможет снять сезонные и географические ограничения исследований и станет основой для создания Криобанка на Дальнем Востоке. Единый Криобанк, в создании которого заинтересованы многие институты ДВО РАН, будет востребован при криоконсервации гамет, эмбрионов и клеточных культур, а в дальнейшем при создании сетей национальных или международных генетических криобанков для сохранения и рационального использования биоресурсов.

В предварительных экспериментах нами были получены обнадеживающие результаты по использованию криопротекторной смеси, в состав которой входили определенные липидные экстракты, мембранные стабилизаторы (углеводной природы) и биоантиоксиданты. В результате патентного поиска обнаружены источники информации, использующие по отдельности каждый из компонентов заявляемой криопротекторной смеси. Однако применение в качестве криопротекторов комбинации трех важнейших компонентов позволит значительно снизить потери биологической активности клеток морских беспозвоночных после размораживания за счет кумулятивного эффекта. Результаты будут востребованы в криобиологии, клеточной биологии и морской биотехнологии.

# ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕОЛИТОВ МЕСТОРОЖДЕНИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА *IN VITRO*

Голохваст Кирилл Сергеевич  
Институт нефти и газа ДВГТУ  
Владивосток, ул. Пушкинская, 37, каб. 6  
e-mail: [droopy@mail.ru](mailto:droopy@mail.ru)

## Краткая аннотация

Предлагаемая нами серия цитологических, биотехнологических и микробиологических экспериментов позволит выяснить наличие биологических свойств цеолитов *in vitro* как на культуре клеток животных и человека, так и на микроорганизмах.

Работа имеет прямое прикладное значение:

1. Получение методики направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток;
2. Получение биологически активной добавки (БАД) с антиоксидантными, иммуностимулирующими и антиопухолевыми свойствами;
3. Получение БАД с пробиотическими свойствами.

## Введение

В последнее время природные минералы находят все более широкое применение в медицинской практике. Наиболее перспективными минералами для медицины пока считаются цеолиты, а также некоторые представители из группы глинистых, во всяком случае, именно этим минералам посвящено наибольшее количество оригинальных исследований. (Махонько Н.И. и др., (1994); Mumpton F. A., (1999); Паничев А.М. и др., (2003); Павленко Ю.В., (2006); Гамидов М.Г., (2007)). Число оригинальных статей по данной тематике только за последние 5 лет в мировой литературе переваливает за сотню, а это, учитывая новизну медицинской минералогии как науки и ограниченное распространение цеолитов в мире, не мало. Все эти исследования проводились с использованием исключительно энтерального способа введения минералов внутрь организма *in vivo*.

При испытании *in vivo* не всегда получается адекватно оценить эффект воздействия минералов на клеточном уровне и чаще всего результаты таких исследований заключаются в описании жизнеспособности животных (процент



выживаемости), метрических данных (вес, рост, длина), уровня различных веществ в сыворотке крови или структуре органов. Такие работы, несомненно, нужны, так как способствуют накоплению фактического материала в плане изучения взаимодействия живых и минеральных объектов. Хотя, необходимо отметить, что на данном этапе становления биомедицинской минералогии как науки, необходимо накопление данных о непосредственном взаимодействии минералов с клетками на микроскопическом ультраструктурном уровне.

В зарубежной литературе имеется несколько сообщений о том, что природные минералы – цеолиты в концентрации 50 мг/мл проявляют антиканцерогенные свойства *in vitro* (Pavelic K. et al., 2001a; 2001b; 2002; Colic M. et al., 2002). В отечественной доступной нам литературы подобных данных мы не обнаружили.

Целью настоящего исследования, во-первых, является изучение биологического (цитотоксического, иммуномодулирующего, цитодифференцирующего и возможного противоопухолевого) действия цеолитов Куликовского и Вангинского месторождения Амурской области, Чугуевского и Ванчинского месторождения Приморского края, Огоньковского месторождения Сахалинской области и Люльинского месторождения Урала *in vitro* в концентрациях 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 мг/мл. Кроме оценки роста колоний клеток необходимо проводить микроскопирование, как на световом, так и на ультраструктурном уровне.

Также имеются сообщения о направленной дифференцировке стволовых клеток с помощью кристаллов апатита (Кисилева Е.В. и др., 2007). Учитывая некоторое количество работ (Татаренко-Козмина Т.Ю., 2007; Спичкина О.Г., 2008), посвященных проблеме индуцированной дифференцировки, следует попробовать культивировать мезенхимальные стволовые клетки совместно и кристаллами цеолитов месторождений Дальнего Востока.

### **Характеристика проекта**

Экспериментальные исследования планируются при участии Дальневосточного государственного технического университета, Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН, Дальневосточного государственного университета, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае».

Для оценки цитотоксичности веществ, роста клеток и антиопухолевого действия будут использованы культуры: опухолевые клетки НТ-29 (рак кишечника), мезенхимальные стволовые клетки, альвеолярные макрофаги, лимфоциты и клетки линии JB6 Cl41 с применением MTS-метода и метода мягкого агара.

Для оценки пробиотического действия будут использованы культуры микроорганизмов: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus subtilis* и других представителях естественной микрофлоры кишечника человека и животных с использованием стандартных методик.

### **Прогнозируемый результат**

Нами уже были получены некоторые результаты относительно биологических свойств цеолитов. При ингаляционном введении цеолиты Вангинского и Куликовского месторождения (Голохваст К.С. и др., 2005-2008) обладают криопротекторным действием по отношению к системе местного иммунитета дыхательных путей у крыс и антиоксидантным эффектом. Кроме того, цеолиты проявили себя как вещества с иммуномодулирующим действием, достоверно меняя популяционное соотношение между альвеолярными макрофагами и лимфоцитами *in vivo*. Учитывая необходимость постоянной стимуляции иммунной системы антигенами (в условиях стерильности альвеол легких в норме), можно предположить, что вдыхание минеральной пыли является необходимым для функционирования иммунной системы легких и имеет важное эволюционное значение. Необходимо повторить эксперименты с использованными нами ранее иммунными клетками *in vitro* с добавлением цеолитов. Это поможет попытаться раскрыть патогенез некоторых заболеваний бронхолегочной системы, испытывающей на себе каждый день давление такого фактора, как минеральная пыль.

В проведенных нами исследованиях, цеолиты Куликовского и Люльинского месторождения *in vitro* в концентрациях (0,01, 0,1 и 1 мг/мл) достоверно не проявляли токсичности в отношении нормальных клетках кожи мышей JB6 Cl41. Также цеолиты этих месторождений достоверно не ингибировали рост колоний клеток рака кишечника HT-29 в мягком агаре при нетоксичных концентрациях (0,01, 0,1 и 1 мг/мл). Требуется дальнейшие эксперименты в данном направлении.

Учитывая, имеющиеся сообщения о положительном влиянии цеолитов на бактерии, обитающие в человеческом кишечнике (Vesna L. et al., 2004), имеет смысл изучить возможность совместного применения цеолитов разных месторождений и культур бифидо- и лактобактерий с последующим созданием БАД. Такой пример создания БАД уже существует - Бактистатин® (производит ОАО «Щелковский витаминный завод»). Здесь применяется цеолит одного конкретного месторождения Центральной России и *Bacillus subtilis*. Как известно на Дальнем Востоке существует

более 10 крупных месторождений цеолитов и каждое характеризуется уникальным составом, поэтому следует с помощью микробиологических методов оценить возможность создание подобного БАД или диетического кисломолочного продукта на основе цеолитов Дальнего Востока.

Кроме прикладного значения данных исследований в таких областях как прикладная биотехнология, терапевтическое клонирование и иммунопрофилактика, в этом проекте имеются и фундаментальные аспекты. Например, нами высказана теория возможного нахождения на клетках живых организмов специфических рецепторов к минералам. Эта теория может получить подтверждение в результате этой запланированной работы.

Стоит отметить достаточно привлекательность экономической составляющей проекта. Цеолиты – это очень дешевый в получении продукт. Кроме того, месторождения цеолитов на Дальнем Востоке расположены в непосредственной близости от населенных пунктов, поэтому транспортные расходы будут минимальными. Стоит отметить также отсутствие аллергических реакций на введение в организм природных минералов. На сегодняшний день на рынке БАД имеются добавки на основе цеолита, например, «Литовит». Стоимость банки 140 г составляет от 130 до 240 рублей. Наш проект, благодаря техническим инновациям (по результатам предварительных исследований нами получены 3 приоритетные заявки на изобретения), позволит удешевить производство и сделать БАД на основе цеолита доступным для жителей Дальнего Востока и России.

### **Список литературы**

1. Гамидов М.Г. Эффективность использования цеолитов Приамурья при желудочно-кишечных болезнях животных и птицы: Автореф. дисс. д-ра ветер. наук. Улан-Удэ, 2004.
2. Кисилева Е.В., Воложин А.И., Васильев А.В., Терских В.В. Мультикомпонентные клетки стромы жировой ткани – новый источник остеопрогениторных клеток для реконструктивной медицины / Труды симпозиума с международным участием «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза», Москва, 2007. С. 81-82
3. Махонько Н.И., Наумов Д.В., Адамов О.А. Гигиенические аспекты использования природных цеолитов в национальной экономике. Обзор // Гигиена и санитария, 1994, №7, С. 26-30

4. Паничев А.М., Кулаков Ю.В., Гульков А.Н. Применение цеолитов в медицине // Тихоокеанский медицинский журнал, 2003. №4. С. 21-24.
5. Спичкина О. Г. Обогащение культуры кератиноцитов человека стволовыми клетками путем селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса: Автореф. дисс... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2008.
6. Татаренко-Козмина Т. Ю. Патофизиологические механизмы применения мезенхимальных стволовых клеток на синтетических композитах для оптимизации регенерации костной ткани (лабораторно-экспериментальное исследование): Автореф. дисс... д-ра биол. наук. Москва, 2007.
7. Colburn N. H., Wendel E. J. and Abruzzo G. // 1981 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(11), 6912-6916
8. Colic M. Pavelic, K. Cellular mechanisms of immunomodulatory activities of silicate materials / Journal of tumor marker oncology. 2002. 17. 63-68
9. Mumpton F.A. La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 96, Issue 7, 3463-3470, March 30, 1999
10. Pavelic K., Subotic B., Colic M. Biomedical applications of zeolites / 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, 8-13 July, 2001. Vol. 135. P. 170.
11. Pavelic K. et al. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy / J. Mol. Med., 2001, 78. P. 708–720
12. Pavelic K. et al. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic activity / J. Cancer Res. Clin Oncol, 2002, 128. P. 37-44
13. Prebiotic activity of zeolite based products / Vesna L., Ivkovic S., Vesna T. // 5-th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, San Francisco, SAD, 2004. P. 18-19.

#### **Список трудов автора по поводу изучения цеолитов**

1. Применение цеолитов Вангинского месторождения в медицине / Голохваст К. С., Целуйко С.С., Штарберг М.А., Штарберг С.А., Гамидов М.Г., Кодинцев В.В. // Тезисы докладов XII Российско–Японского международного медицинского симпозиума, Красноярск, 2005. С. 477-479.
2. Голохваст К.С. Оценка физиологического состояния некоторых элементов системы местного иммунитета нижних дыхательных путей (экспериментальное исследование): Автореф. дисс... канд. биол. наук. Благовещенск, 2006.

3. Голохваст К.С., Целуйко С.С. Иммуномодулирующие свойства цеолитов Вангинского месторождения при ингаляторном введении в условиях общего охлаждения / Дальневосточный медицинский журнал, 2006. №3. С. 92-94.
4. Голохваст К.С., Целуйко С.С. Влияние цеолитов на систему местного иммунитета нижних дыхательных путей в эксперименте / Сборник трудов XVI Национального конгресса по болезням органов дыхания // под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина и др., Санкт-Петербург, 14-17 ноября 2006 г. Санкт-Петербург, 2006. С. 116.
5. Голохваст К.С., Целуйко С.С., Штарберг М.А. Антиоксидантные свойства цеолитов Вангинского месторождения при ингаляторном введении в условиях общего охлаждения / Бюл. физиол. и патол. дыхания, 2006. №22. С. 86.
6. Голохваст К.С., Целуйко С.С., Штарберг М.А., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А. Антиоксидантные свойства цеолитов Вангинского месторождения при ингаляционном пути введения // Материалы IV международного семинара «Минералогия и жизнь: Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия», Сыктывкар, Республика Коми, 22-25 мая 2007. – С. 166-167
7. Голохваст К.С., Штарберг М.А., Целуйко С.С., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А. Иммуномодулирующие свойства цеолитов Вангинского месторождения Амурской области при ингаляционном пути введения // Материалы IV международного семинара «Минералогия и жизнь: Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия», Сыктывкар, Республика Коми, 22-25 мая 2007. – С. 168-170
8. Голохваст К.С., Штарберг М.А., Целуйко С.С., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А. Свойства цеолитов Куликовского и Вангинского месторождения при ингаляционном пути введения в сочетании с низкоэнергетическим лазерным излучением// Материалы IV международного семинара «Минералогия и жизнь: Происхождение биосферы и коэволюция минерального и биологического миров, биоминералогия», Сыктывкар, Республика Коми, 22-25 мая 2007. – С. 170-171
9. Голохваст К.С., Штарберг М.А., Целуйко С.С., Гамидов М.Г., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А., Баталова Т.А. Биологические свойства цеолитов Вангинского месторождения // Психофармакология и биологическая наркология, 2007. - Т.7 (спецвыпуск) – ч.1 – С. 1661
10. Голохваст К.С., Штарберг М.А., Целуйко С.С., Гамидов М.Г., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А., Баталова Т.А. Биологические свойства цеолитов Куликовского

11. Борисов С.Ю., Голохваст К.С., Штарберг М.А., Целуйко С.С., Гамидов М.Г., Сергеевич А.А., Баталова Т.А. Свойства цеолитов в сочетании с низкоэнергетическим лазерным излучением // Психофармакология и биологическая наркология, 2007. - Т.7(спецвыпуск) – ч.1 – С. 1618
12. Influence of zeolites in combination with low energetic laser radiation on lipids peroxide oxidation / Golokhvast K.S., Starberg M.A., Tseluyko S.S., Gamidov M.G., Borisov S.Yu., Sergeevich A.A., Batalova T.A. // Book of Abstract Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia Medical Exchange Foundation (1992-2007) – P. 53
13. Influence of zeolites of the Kulikov deposit on lipids peroxide oxidation / Golokhvast K.S., Starberg M.A., Tseluyko S.S., Gamidov M.G., Borisov S.Yu., Sergeevich A.A., Batalova T.A. // Book of Abstract Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia Medical Exchange Foundation (1992-2007) – P. 53
14. Influence of zeolites of the Vangin deposit on lipids peroxide oxidation / Golokhvast K.S., Starberg M.A., Tseluyko S.S., Gamidov M.G., Borisov S.Yu., Sergeevich A.A., Batalova T.A. // Book of Abstract Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia Medical Exchange Foundation (1992-2007) – P. 54
15. Голохваст К.С. О возможных клеточных рецепторах к неорганическим кристаллическим лигандам / Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов, 2007. № 12. С. 122-123
16. Голохваст К.С., Паничев А.М. О протекторном действии цеолитов на систему местного иммунитета дыхательных путей / Вестник новых медицинских технологий, 2008 (в печати)
17. Голохваст К.С., Паничев А.М., Гульков А.Н. Использование цеолитов в медицине и ветеринарии / Вестник ДВО РАН, 2008 (в печати)
18. Голохваст К.С., Паничев А.М., Борисов С.Ю. Возможная роль минералов в стимуляции иммунитета дыхательных путей / Российский иммунологический журнал, 2008 (в печати)
19. Голохваст К.С., Паничев А.М., Штарберг М.А., Борисов С.Ю., Сергеевич А.А. Немедикаментозная терапия как основа восстановительной медицины / Тихоокеанский медицинский журнал, 2008 (в печати)

20. Голохваст К.С., Ермакова С.П., Паничев А.М., Кусайкин М.И. Изучение цитотоксичности и противоопухолевой активности цеолитов Куликовского и Люльинского месторождения на культуре клеток НТ-29 и JB6 С141 / Цитология, 2008 (в печати)

## **СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНОЙ ДОБАВКИ С КАНЦЕРПРЕВЕНТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ААПТАМИНА**

Дышловой Сергей Анатольевич

*Дальневосточный государственный университет*

*690039 г. Владивосток, ул. Кирова, 19/2, кв. 61.*

*E-mail: dishlovoy@mail.ru*

### **Аннотация**

Заявляемый проект включает в себя создание биологически-активной добавки (БАД) с канцерпревентивными свойствами (предотвращающей образование и тормозящей рост злокачественных опухолей) на основе ааптамина. Впервые проведённое нами комплексное исследование противоопухолевых свойств этого соединения показало его способность предотвращать рост опухолей и останавливать перерождение нормальных клеток в раковые концентрации, меньше токсичных, по крайней мере, в 20 раз, что является хорошим показателем.

### **Введение**

Проблема опухолевых заболеваний является одной из острейших проблем современного здравоохранения. Рак (злокачественные опухолевые заболевания) является одной из основных причин смерти в мире. По данным ВОЗ в 2005 г. от рака умерло 13 % от общего числа умерших людей. Основными формами рака, приводящими к смерти, являются рак легких (1,3 миллиона случаев смерти в год), рак желудка (около 1 миллиона случаев), рак печени (662 000 случаев), рак толстого кишечника (655 000 случаев) и рак молочной железы (502 000 случаев смерти в год). За последние 25 лет заболеваемость раком выросла в 1,5-2,0 раза, причем особенно тревожно положение в развитых странах. Для различных разновидностей рака характерна одна общая черта – эти болезни чрезвычайно трудно излечить. Следует признать, что лечение рака в настоящее время высоко затратно и сравнительно мало

эффективно. Считается, что в основе канцерогенеза (опухолевого перерождения клеток) лежит возникновение мутаций в специфических генах, в результате которых выводятся из строя гены-онкосупрессоры и активируются онкогены. В основе других теорий возникновения рака лежит анеуплоидия - крупные перестройки хромосом. Они могут привести вначале к дестабилизации генома, а затем к мутациям в генах, ассоциированных с раком. В любом случае, не вызывает сомнений, что решающую роль в канцерогенезе играют действие внешних факторов и влияние опухолевых промоторов (форболовые эфиры, избыток некоторых ростовых факторов). К внешним факторам можно отнести физические канцерогены (ультрафиолетовое и ионизирующее излучение), химические канцерогены (например, асбест, оксиданты и табачный дым) и биологические канцерогены (различные инфекции, микотоксины пищевых продуктов, вызывающие рак печени). В то же время считается, что до 40 % случаев заболевания раком можно предотвратить с помощью здорового рациона питания, физической активности и воздержания от употребления табака. Кроме того, профилактика рака может включать употребление различных продуктов и биопрепаратов, содержащих вещества, тормозящие канцерогенез (антиканцерогены). Кроме использования в составе профилактических препаратов, антиканцерогенные соединения могут быть перспективными для создания на их основе средств лечения широкого круга онкологических заболеваний.

Нами было установлено, что ааптамин (8, 9-диметил-1H-бензо[de]-1,6-нафтиридин) обладает канцер-превентивными свойствами – соединение способно останавливать рост опухолей и перерождение нормальных клеток к раковые в концентрациях, меньше токсичных в 20-280 раз, в зависимости от типа клеток, при этом токсичность самого ааптамина сравнима с токсичностью большого числа используемых в настоящее время лекарственных и профилактических препаратов. Ааптамин оказался особенно эффективен против клеток промиелоцитарной лейкемии человека. Нами было установлено, что механизм действия соединения носит p53-независимый характер, а это означает, что вещество будет токсично даже для p53-дефицитных клеток (к числу которых относится большинство опухолевых клеток). Также установлено, что сигнальный путь Ras играет важную роль в токсическом действии ааптамина на раковые клетки.

В своей работе по изучению биологической активности мы использовали такие современные (в том числе новые для России) методы как методы изучения апоптоза или влияния изучаемых веществ на клеточный цикл с использованием проточного



цитометра, метод мягкого агара для определения антиканцерогенной активности, метод определения транскрипционной активности, зависисмой от некоторых ядерных факторов, MTS- метод определения цитотоксичности, эксперименты с применением генетически измененных клеток. В ближайшее время для изучения апоптоза будет использован метод ДНК-лестницы и метод с использованием красителей, таких как Хехст и пропидиум иодид.

### **Характеристика проекта**

Ааптамин является достаточно изученным с химической точки зрения веществом. Проведённый нами литературный поиск показал, что достаточно хорошо изучены различные подходы к синтезу ааптамина и его производных на основе исходных дешёвых доступных соединений, что полностью решает проблему получения продукта. При этом публикаций о биологической активности этого соединений, и в частности о его противоопухолевых свойствах практически нет, это означает что мы будем иметь право запатентовать наше открытие. На начальной стадии проекта будут проведены дополнительные исследования ааптамина и некоторых выделенных его производных как *in vitro* так и *in vivo*, будут определены действующие дозы препарата и некоторые его свойства. Параллельно будет организовано синтетическое производство препарата, выбранная схема синтеза будет наиболее дешёвой и простой в исполнении. И на финальной стадии проекта будет произведена подготовка к выпуску готового препарата.

Существует вероятность, что при дополнительных исследованиях препарат покажет себя как перспективное средство лечения опухолевых заболеваний. В этом случае мы будем работать и в направлении создания лекарственного препарата на основе ааптамина.

### **Прогнозируемый результат проекта**

На сегодняшний день по данным ВОЗ в мире насчитывается около 10 миллионов людей, больных онкологическими заболеваниями. По прогнозам к 2030 году это цифра возрастёт в 3 раза. Это говорит о том, что спрос на препараты, подобные нашему будет только увеличиваться. В миру существует крайне ограниченное число препаратов, способных тормозить рост и предотвращать образование опухолей в столь малой (по отношению к токсичной) концентрации. Поэтому создаваемый нами препарат будет конкурентоспособным как на отечественном, так и на международном рынках. Предлагаемый нами препарат

может быть использован при лечении рака (как средство, останавливающее его прогрессирование), а также для его профилактики у людей, входящих в группу риска (работающих на вредных производствах, получивших дозы облучения, болевших ранее раком).

## **МОДЕЛИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И БИОТЕСТИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ И АНАЛОГОВ МОРСКОГО АЛКАЛОИДА ФАСКАПЛИЗИНА**

Жидков Максим Евгеньевич

*Дальневосточный государственный университет*

*г. Владивосток, ул. Хабаровская, 12<sup>о</sup>, кв. 22*

*e-mail: [mzhidkov@rambler.ru](mailto:mzhidkov@rambler.ru)*

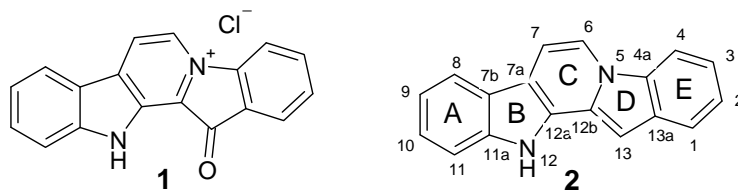
### **Краткая аннотация**

Представленный проект включает в себя моделирование и получение на основе разработанного ранее нами метода синтеза пиридо[1,2 a:3,4 b']дииндольной гетероциклической системы серии производных и аналогов морского алкалоида фаскаплизина – соединения-лидера, перспективного для создания нового поколения препаратов для терапии злокачественных новообразований. Полученные соединения представляют коммерческий интерес ввиду их заведомо высокой биологической активности, а также возможностью проведения их сравнительного биотестирования и создания на основе полученной информации базы данных о зависимости между структурой аналогов и производных фаскаплизина и проявляемой ими биологической активностью.

### **Введение**

Рынок лекарственных препаратов в настоящее время стал одним из ведущих как по общему обороту средств, так и по получаемой прибыли. Достижения современной фармакологии и клинической медицины во многом определяются постоянным внедрением в лечебную практику новых лекарств. В этой связи огромные финансовые и материально-технические ресурсы сосредоточены в сфере исследований в области совершенствования существующих лекарственных форм и разработки новых препаратов.

Опухолевые заболевания является одной из острейших проблем современной медицины, так как остаются одной из основных причин смерти в мире. Существующие методы лечения отличаются недостаточной эффективностью и пагубно сказываются на организме в целом. Одним из направлений создания нового эффективного лекарственного препарата для лечения онкологических больных является разработка эффективного селективного ингибитора циклинзависимой киназы 4 (далее ЦДК 4) – фермента, участвующего в регуляции клеточного цикла и ответственного за развитие более 60 % видов злокачественных опухолей у человека.



Одним из самых эффективных ингибиторов ЦДК 4, известных на сегодняшний день, является морской алкалоид фаскаплизин (1). Терапевтическое использование данного соединения ограничивает его высокая токсичность, вместе с тем, изучение биологической активности производных и аналогов фаскаплизина, создание которых является целью данного проекта, представляется весьма перспективным.

### Характеристика проекта

Представленный для участия в конкурсе “Умник” проект “Моделирование, синтез и биотестирование некоторых производных и аналогов морского алкалоида фаскаплизина” предполагает решение задач, связанных с направленным моделированием биологически активных веществ, их синтезом, а также проведением сравнительных биоиспытаний для выявления функциональной зависимости между структурой полученных соединений и проявляемой ими биологической активностью. Имеющаяся в нашем распоряжении материально-техническая ресурсы позволяют реализовать поставленные задачи исключительно на базе ДВГУ и ТИБОХ, поэтому в рамках проекта не предполагается привлечение сторонних организаций.

Выбор алкалоида фаскаплизина в качестве модельного соединения обусловлен тем, что данное соединение достаточно хорошо изучено. Таким образом, уже сформирован достаточный задел для проведения целенаправленных исследований в направлении создания его аналогов с улучшенными фармакологическими свойствами. Установлено, что механизм действия фаскаплизина включает в себя подавление процесса деления клеток путем ингибирования фермента

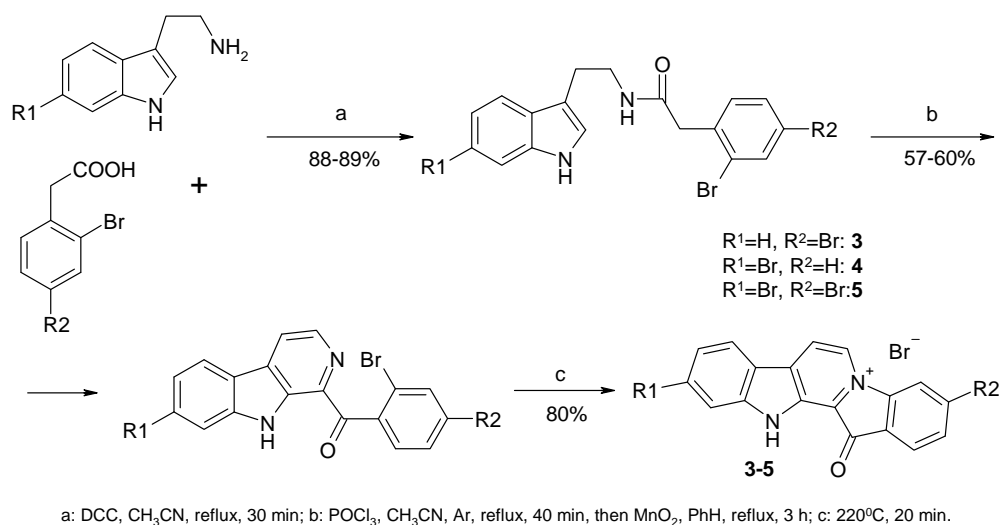
циклинзависимой киназы 4, ответственного за переход между фазами G<sub>0</sub> и G<sub>1</sub> клеточного цикла [1]. Вместе с тем, планарная структура фаскаплизина обуславливает его высокую токсичность за счёт интеркаляции в ДНК, что определяет невозможность применения данного соединения в качестве лекарственного препарата [2]. Исходя из этого, существуют два пути возможной модификации структуры фаскаплизина, связанные с введением в его молекулу функциональных групп и заместителей, либо способствующих её интеграции с ферментом ЦДК 4, либо снижающих её интеркаляционные свойства. В любом случае, результатом подобной структурной трансформации должно стать увеличение показателя терапевтического индекса для модифицированных аналогов по сравнению с модельным соединением.

Решение задачи направленного конструирования аналогов фаскаплизина предполагается путём привлечения методов компьютерного моделирования и молекулярного докинга. Проводившиеся ранее кинетические исследования свидетельствуют о том, что фаскаплизин обратимо взаимодействует с сайтом связывания АТФ фермента ЦДК 4. Кроме того, была разработана трёхмерная модель данного сайта [1]. Имеющихся данных позволяют провести в рамках представленного проекта молекулярный докинг широкого набора соединений – аналогов фаскаплизина и, таким образом, ограничить круг веществ, предназначенных непосредственно для синтеза, только наиболее перспективными соединениями.

Исследования в области создания аналогов фаскаплизина ранее уже проводились [3]. Их результатом стало получение нескольких серий веществ различного строения, обладающих способностью селективно ингибировать рассматриваемую терапевтическую мишень, но, при этом, значительно уступающих алкалоиду **1** как по эффективности, так и селективности действия. Ключевое отличие представленного проекта от данных исследований заключается в том, что мы предполагаем получение соединений, основу которых составляет скелет фаскаплизина, тогда как все предыдущие работы исходили из соединений, лишь отдаленно напоминающих его структуру. Это связано со сложностью формирования пентациклической гетероциклической системы пиридо[1,2 a:3,4 b']ди-индола (**2**) (см. рис.), лежащей в основе фаскаплизина.

Для реализации представленного проекта первостепенное значение имеет разработка эффективного метода синтеза гетероциклической системы **2**, обеспечивающего получение широкого набора её производных, различающихся как

по месту расположения, так и природе функциональных групп и заместителей, входящих в их структуру.



На сегодняшний день нами на основе стратегии, применявшейся ранее для получения фаскаплизина [4], осуществлены первые полные синтезы трёх природных бромпроизводных фаскаплизина: 3-бромфаскаплизина (**3**), 10-бромфаскаплизина (**4**) и 3,10-дибромфаскаплизина (**5**) [5]. Наряду с получением указанных алкалоидов, итогом проделанной работы стала разработка уникальной методологии, позволяющей формирование скелета фаскаплизина всего в три стадии (см. схему) [6].

По мере получения аналогов фаскаплизина предполагается определение биологической активности синтезированных веществ методами экспресс-диагностики в условиях *in vitro*. Проведение всесторонних биоиспытаний каждого конкретного соединения требует значительных финансовых затрат, времени и наработки исследуемого вещества в значительных количествах. Данный проект не предполагает проведение подобных исследований. Вместе с тем, с помощью методов экспресс-диагностики в условиях *in vitro* для каждого синтезированного аналога фаскаплизина будут определены константа ингибирования ЦДК 4, а также сродство к ДНК, характеризующие интеркаляционные свойства исследуемых соединений. Эти данные позволят объективно оценить, насколько результаты, полученные методами компьютерного моделирования, соотносятся с действительностью, а также определить направления дальнейшей структурной модификации фаскаплизина.

## Прогнозируемый результат проекта

В настоящее время как в нашей стране, так и за рубежом фармацевтические компании охотно приобретают вещества, обладающие высокой биологической активностью, с целью проведения их всестороннего биотестирования. В результате чего сформировался рынок коммерциализации достижений научных исследований, связанных с выделением из природных источников или направленным синтезом химических соединений. Результатом реализации представленного проекта должно стать создание коммерческого продукта, представляющего собой серию производных и аналогов морского алкалоида фаскаплизина, обладающих выраженным цитостатическим действием и перспективных в плане их использования как противоопухолевых лекарственных препаратов. В качестве потребителей данного продукта рассматриваются фармакологические компании и научно-исследовательские центры, специализирующиеся на поиске и разработке новых лекарственных средств.

Актуальность предмета исследований, заявленных в проекте, а именно, работы в области синтеза производных и аналогов фаскаплизина с целью выявления корреляционной зависимости между их структурой и проявляемой биологической не вызывает сомнений, о чём свидетельствуют предварительные биоиспытания бромпроизводных фаскаплизина, полученных нами ранее. В частности, 3-бром-фаскаплизин показал в десять раз большую цитотоксическую активность по сравнению с фаскаплизином в отношении некоторых линий опухолевых клеток [5].

Представленное исследование построено таким образом, чтобы обеспечить получение целевого продукта с максимальной экономической выгодой. С этой целью была разработана универсальная методология, которую отличает возможность применения для синтеза широкого набора производных фаскаплизина, содержащих различные функциональные группы и заместители в циклах А и Е (см. рис., структура 2). Возможность работы в рамках одной методологии позволит многократно сократить затраты на синтез каждого конкретного аналога фаскаплизина. При реализации всех стадий используются хорошо изученные реакции, что определяет возможность оптимизации условий их проведения. Характер выбранной синтетической стратегии исключает на каком-либо этапе возможность получения смеси изомеров, что позволяет избежать трудоёмких операций по их разделению. Названные преимущества в сочетании с малым числом стадий позволяют говорить об эффективности данной методологии как с экономической, так и с технологической точек зрения. Кроме того, данный подход с

успехом может быть оптимизирован для производства производных фаскаплизина в полупромышленных масштабах.

Вместе с тем, затраты на синтез любого производного фаскаплизина остаются достаточно высокими, что определяет невозможность получения серии подобных соединений, состоящей из десятков представителей. Исходя из этого, предполагается ограничить круг претендентов для синтеза только наиболее перспективными соединениями путём проведения предварительных расчётов структур целевых соединений методами компьютерного моделирования.

### **Список литературы**

1. Soni R. L., Muller, Furet P., Schoepfer J., Stephan C., Zunstein-Mecker S., Fretz H., Chaudhuri B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 2000.- № 275.- P. 877-884.
2. Hormann A., Chaudhuri B., Fretz H. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*- 2001.- № 9.- P. 917-921.
3. Mahale S., Aubry C., Wilson A. J., Jenkins P. R., Marechal J-D., Sutcliffe M. J., Chaudhuria B. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*- 2006.-№ 16.- P. 4272-4278.
4. Radchenko O. S., Novikov V. L., Elyakov G. B. // *Tetrahedron Lett.*- 1997.-V. 38, № 30.- P. 5339-5342.
5. Segraves N. L., Robinson S. J., Garcia D., Said S. A., Fu X., Schmitz F. J., Pietraszkiewicz H., Valeriote F. A., Crews P. // *J. Nat. Prod.*- 2004.- № 67.- P. 783-792.
6. Zhidkov M. E., Baranova O. V., Balaneva N. N., Fedorov S. N. Radchenko O. S., Dubovitskii S. V. // *Tetrahedron Lett.*- 2007.-V. 48, № 45.- P. 7998-8000.

# РАЗРАБОТКА И СОЗДАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И/ИЛИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ВЕЩЕСТВ С УСТАНОВЛЕННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРОЙ

Захаренко Александр Михайлович

*Тихоокеанский институт биоорганической химии*

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

## **Краткая аннотация проекта**

Проект направлен на разработку и создание нового поколения лекарственных средств и/или биологически активных добавок на основе веществ с установленной химической структурой.

Проектом предусматриваются исследования структуры, физико-химических свойств и биологической активности фукоиданов из различных видов бурых водорослей.

В рамках проекта будут получены фукоиданы и их производные, установлены их структурные характеристики, разработаны методы стандартизации образцов, полученных промышленным способом, выполнены комплексные исследования действия фукоиданов и их производных на разные звенья иммунитета. Проведен отбор наиболее активных препаратов и исследованы их иммунобиологические свойства и токсичность.

На основе проведенных исследований планируется выработать рекомендации по созданию на основе фукоиданов БАДов и лекарственных препаратов.

## **Введение**

В настоящее время остается актуальным поиск новых высокоэффективных, малотоксичных лекарственных препаратов из природных источников. Лучшей основой для этого являются природные биорегуляторы, вещества, передающие в организме информацию и управляющие многочисленными биохимическими реакциями, составляющими материальную основу жизни. Очень перспективными в этом смысле являются полисахариды и углеводсодержащие биополимеры растительного происхождения.

В основе фармацевтического потенциала углеводов, углеводсодержащих биополимеров лежат уникальные функции, включая хранение энергии, транспорт, модуляцию функциональных белков, межклеточной адгезии, сигнальной



трансдукции, трансформации опухолей, распознавание поверхности вирусных и бактериальных клеток. В то же время низкая токсичность данных веществ для организма, экологически чистые и экономичные технологии их производства привлекают внимание исследователей.

Отечественные ученые, работающие с синтетическими полиэлектролитами, показали, что полианионы и поликатионы, благодаря способности к многоточечному кооперативному взаимодействию с поверхностью клеток, в том числе лимфоцитов, могут обеспечивать выраженную стимуляцию различных этапов иммуногенеза. В связи с этим поликатионные и полианионные полисахариды, широко представленные в морских водорослях и ракообразных, могут рассматриваться как потенциальные иммуномодуляторы. Это представляет большой интерес, так как состояние здоровья современного человека с иммунобиологических позиций характеризуется снижением иммунологической реактивности и повышением острой и хронической заболеваемости, вызываемой условно-патогенными микроорганизмами. Результатом этого является необычайно большой интерес врачей практически всех специальностей к проблеме иммунотерапии.

Фукоиданы представляют собой семейство водорастворимых высокосульфатированных (полианионных), обычно разветвленных гомо- и гетерополисахаридов, где основным моносахаридным остатком является L-фукоза. Кроме фукозы в их составе обнаружены галактоза, манноза, ксилоза и глюкуроновая кислота. Богатым и легко возобновляемым источником фукоиданов являются бурые водоросли. Разные виды бурых водорослей значительно различаются по содержанию фукоиданов и их структурным характеристикам. Структурные исследования фукоиданов значительно отстают от изучения их биологической активности. Прежде всего, это связано со сложностью структур фукоиданов. Связь между структурой этих полисахаридов и их биологической активностью практически не изучена, поэтому исследование структуры фукоиданов в настоящее время является приоритетной задачей.

В ТИБОХ ДВО РАН проводятся химические исследования фукоиданов из различных источников. В настоящее время создана коллекция фукоиданов и их производных, полученных химической и ферментативной трансформацией природных полисахаридов, разработаны методы препаративного разделения полисахаридов бурых водорослей, которые позволяют получать фукоиданы стандартные по структурным характеристикам.

## **Характеристика проекта**

### **Цели исследования**

Целью данного проекта является разработка нового высокоэффективного, малотоксичного препарата, обладающего широким спектром биологической активности, в том числе противоопухолевой, иммуностимулирующей. А так же снижение себестоимости препарата, повышающее его доступность для потребителя.

В ходе решения проекта предусматриваются фундаментальные исследования структуры, физико-химических свойств и биологической активности фукоиданов из различных видов бурых водорослей. Планируется:

- провести анализ рынка с целью изучения спроса и выявить конкурентные преимущества предлагаемого препарата;
- получение фукоиданов и их производных;
- установление их структурных характеристик;
- разработка методов стандартизации образцов, полученных промышленным способом;
- разработка методов стандартизации полученных образцов;
- выполнение комплексного исследования биологического действия фукоиданов и их производных на разные звенья иммунитета;
- изучение механизма действия наиболее активных препаратов.

### **Методы решения проблемы**

При решении данной проблемы будут применены классические методы химии углеводов, а также такие методы энзимологии как деградация полисахаридов специфическими ферментами – фукоиданазами. Для исследования структуры и механизма действия фукоиданаз планируется использовать химические и физико-химические (масс-спектрометрию и ЯМР-спектроскопию) методы. Исследование фукоиданов методом масс-спектрометрии практически не развито и требует разработки, т.к. этот метод очень эффективен и позволяет быстро определять не только состав поли- и олигосахаридов, но и элементы их структуры. Метод масс-спектрометрии, незаменим в решении проблемы контроля качества препаратов и их стандартизации.

Определение биологической активности препаратов на основе фукоиданов будет проводиться различными методами.

Для оценки влияния препаратов на неспецифическую резистентность организма будет исследована масса и клеточность центральных и периферических

органов иммунитета, функциональная активность нейтрофилов и макрофагов (фагоцитарная и бактерицидная активность), выживаемость и средняя продолжительность жизни неинбредных мышей с экспериментальной инфекцией.

С целью определения влияния препаратов на гуморальный иммунный ответ будет определено число антителообразующих клеток в селезенке и титры антител, а в сыворотке ответ на антигены.

Для определения влияния препаратов на клеточный иммунный ответ планируется исследовать реакцию гиперчувствительности замедленного типа (спонтанную и индуцированную митогенами, пролиферацию лимфоцитов).

Для определения противоопухолевой активности планируется провести серию исследований на различных типах опухолевых клеток, а так же исследование противоопухолевой активности *in vivo*.

### **Прогнозируемый результат проекта**

В результате работы над проектом будут:

- разработаны схемы выделения фукоиданов из бурых, выбраны оптимальные условия для получения структурно однородных препаратов фукоиданов;
- изучены структурные характеристики различных фукоиданов, на основе этого исследования отобраны образцы фукоиданов для биологических испытаний;
- исследована биологическая активность фукоиданов: токсичность и иммунобиологические свойства ;
- получены продукты химической и ферментативной трансформации фукоиданов;
- исследована биологическая активность полученных продуктов: токсичность и иммунобиологические свойства ;
- выработаны рекомендации по созданию на основе фукоиданов лекарственного средства.

### **Оценка масштабов применения**

На рынке противоопухолевых препаратов остается много незаполненных ниш. Почти все новые лекарственные средства, появляющиеся в онкологии, представляют собой очередную попытку сбалансировать избирательность, эффективность и токсичность препарата. В то же время, для некоторых видов рака идеальным решением было бы создание терапевтических вакцин, действие которых направлено на опухолевые антигены. Онкологические вакцины потенциально могут иметь

высокую избирательность и низкую токсичность, однако до сих пор многие вакцины терпят неудачу в клинической практике. Виной тому не только проблемы научно-теоретического характера, но и относительная неразвитость рынка.

Анализ различных факторов позволяет прогнозировать рост российского рынка противоопухолевых и иммуностимулирующих препаратов. Мировые тенденции развития производства однозначно ведут к его усложнению, усилению глубины переработки, степени извлечения и очистки действующих компонентов.

Рынок противоопухолевых средств увеличился за 10 лет с 1991 г. по 2000 г. включительно более чем в три раза с 4,35 млрд. долл. до 15,17 млрд. долл. соответственно. В 2006г только российский рынок составил 187,7 млн. долл.

В связи с тем, что проблемы здоровья населения становятся все более и более социально значимым, в СМИ поддерживается высокий уровень проблемных дискуссий, ориентирующих жителей на необходимость профилактики всевозможных заболеваний, на необходимость использования экологически безопасных лекарств, не обладающих побочным действием.

Нами планируется разработка препарата, который не только обладает противоопухолевым и иммуномодулирующим действием, но также является онкопрофилактическим препаратом и, что особенно важно, не обладает побочным действием на организм.

## **ЭКСТРАКЦИЯ РЕДКИХ МЕТАЛЛОВ ИЗ КАРЬЕРНЫХ ВОД ОТРАБОТАННЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ АЦИЛИРОВАННЫМИ ПОЛИЭТИЛЕН ПОЛИАМИНАМИ**

Никонов Антон Олегович

*Институт органической химии Уфимского научного центра РАН,*

*Российская Федерация, 450054 Уфа, просп. Октября, 71*

*E-mail: aoniko@bk.ru*

### **Аннотация**

Проект представляет из себя разработку и внедрение технологической схемы по извлечению редких металлов (на примере индия и галлия) из карьерных и подотвальных вод отработанных месторождений металлических руд (на примере отработанного месторождения Куль-Юрт-Тау, Республика Башкортостан) путем

экстракции этих металлов ацилированными полиэтиленполиаминами, являющимися побочными продуктами получения имидозалинов, производимых Стерлитамакским Закрытым акционерным обществом «КАУСТИК», Республика Башкортостан. Проект затрагивает как острые экологические проблемы, так и проблемы использования находящейся небольшое промышленное применение продукции, а также проблемы получения ценных продуктов – редких металлов, – путем их извлечения из карьерных и подотвальных вод отработанных рудных месторождений.

### **Введение**

Отработанные карьеры месторождений полиметаллических руд очень скоро становятся мощными источниками загрязнения окружающей среды ионами тяжелых металлов. Скорость окисления сульфидных минералов, под воздействием атмосферных факторов, со временем возрастает, что приводит к образованию большого количества минерализованных металлосодержащих сточных вод. Этот процесс хорошо виден при изучении подотвальных вод месторождения Куль-Юрт-Тау.

Месторождение Куль-Юрт-Тау расположено в 5 км к северу от г. Баймака Республики Башкортостан на склоне возвышенности. Открыто в 1914 г. разведочными работами Южно-Уральского Акционерного общества.

После прекращения работ на месторождении, под влиянием атмосферных осадков, и в следствии смешения отвалных пород и хвостов обогащения перколяционной фабрики начался процесс окисления пирита с образованием водорастворимых солей тяжелых металлов и свободной серной кислоты. Процесс этот может продолжаться очень долго, увеличивая зону поражения местности и бассейна местной реки Таналык.

На основании предварительных исследований установлено, что основными загрязняющими компонентами подотвальных вод являются – железо, марганец, сульфат ион а также свинец, кадмий, ртуть, мышьяк, висмут. Так же исследования показали наличие в подотвальных водах ионов редких металлов, в частности галлия (0,003 г/л). Эти стоки имеют высокую кислотность  $pH=0-1$  что говорит о присутствии свободной серной кислоты.

Изучение состава почвенного покрова на территории шириной 400 м на северо-восток от границы отвалов показало высокое содержание минералов железа техногенного происхождения которые образовались вследствие окисления

сульфатов железа (II) до железа (III) и гидролиза последних, при этом происходит сорбция ионов тяжелых металлов. Высокая проницаемость верхнего слоя почвы позволяют предположить, что основной объем кислых сточных вод вместе грунтовыми водами поступает в реку Таналык.

Институтом геологии УНЦ РАН и Сибайским филиалом Академии Наук Республики Башкортостан ведется разработка технологических схем по очистке подотвальных вод указанного карьера от ионов цветных металлов (в частности меди и цинка). Однако эти схемы не предусматривают извлечение микрокомпонентных примесей из этих вод, в частности редких металлов.

Работа, проводимая в Институте органической химии УНЦ РАН, имеет своей целью изучение процесса экстракции редких металлов (в частности индия и галлия) бис-ацилированными полиэтиленполиамины, которые, как показали предварительные опыты, проявляют очень хорошие экстракционные свойства по отношению к ионам редких металлов; а также разработку и внедрение технологической схемы экстракции редких металлов (индия и галлия) из подотвальных и карьерных вод отработанных месторождений (в частности месторождения Куль-Юрт-Тау).

Ацилированные полиэтиленполиамины в значительных количествах образуются при синтезе имидазолинов в качестве побочных продуктов. Имидазолины находят широкое промышленное применение, они являются основой для получения катиоактивных и амфолитных ПАВ, их производство достаточно значительно. Ацилированные полиэтиленполиамины напротив, находят небольшое промышленное применение и довольно дешевы. Производство алкилзамещенных имидазолинов существует в Республике Башкортостан у Стерлитамакского закрытого акционерного общества "Каустик".

Таким образом, при решении актуальной экологической проблемы происходит решение не менее важной проблемы по добыче ценных редких металлов. В данном случае предполагается добыча ценных компонентов из искусственно созданных человеком техногенных месторождений. Деятельность человека в случае добычи полезных ископаемых привела к нарушению естественных потоков веществ, их накоплению (созданию искусственного окислительного геохимического барьера), и созданию новых, неестественных потоков миграции веществ, то есть загрязнению окружающей природной среды. И возможно не только остановить эти миграционные потоки веществ, предотвратив тем самым загрязнение, но и извлечь из этих потоков ценные продукты, сконцентрированные в них.

## Характеристики проекта

На месте выхода подотвальных вод оборудуется гидроизолированный сборник в виде бассейна прямоугольной формы емкостью 200-500м<sup>3</sup>. Из сборника кислые воды насосом подаются в технологический модуль, где происходит еще большее их закисление соляной кислотой до оптимальной кислотности, и из этих вод производится экстракция ценных редких металлов путем многократного использования экстрагента и концентрирования редких металлов. Затем происходит первичная очистка вод от растворенных металлов следующими методами: селективной сорбцией на блоке электроактивных фильтров (концентрат, содержащий свинец, ртуть, мышьяк, кадмий), электрокоагуляцией, окислением фотоиницированным озоном с последующим выделением осадков на гидроциклоне и фильтре (смесь окислов железа и марганца). После первичной очистки вода поступает на нейтрализацию в бетонные желоба заполненные щебенкой из мраморизированных известняков где происходит нейтрализация свободной серной кислоты и более полная очистка от ионов металлов за счет образования нерастворимых в воде карбонатов и гидрокарбонатов металлов, которые скапливаются в специально оборудованных приемках и откачиваются на фильтрование. После узла гидрокарбонатной очистки вода подается на биоплато, засаженное высшими водными растениями, где происходит тонкая доочистка позволяющая производить сброс в открытые водоемы.

Подобная установка не требует больших капитальных затрат при строительстве, производительность ее может быть увеличена простым масштабированием а технологическая схема позволяет работать и замкнутом режиме без слива воды в открытые водоемы (в этом случае очищенные воды направляются на орошение отвалов).

Предлагаемая технология не предполагает применение реагентов, металлы выделяются в виде компактных продуктов - оксидов, гидроокисей и карбонатов, которые легко упаковываются для перевозки на специализированные предприятия для дальнейшей переработки.

Экстракционная установка по извлечению редких металлов предполагает многократное использование экстрагента с целью концентрирования этих металлов для дальнейшей их рекстракции при подобранных оптимальных условиях.

### **Прогнозируемый результат проекта**

Цены на галлий с чистотой 99,99% в России составляют на 05.2008 порядка 530-550 долл. за кг; на индий в Европе – 640-670 долл. за кг.

При содержании галлия в карьерной воде 0,003 г/л возможный экономический эффект при минимальной производительности составит:

По оценкам величина стока вод из карьера по поверхности и с подземными водами составляет 1 м<sup>3</sup>/час. При сохранении существующего уровня оттока карьерных вод количество извлеченного галлия в год при непрерывной работе установки составит:  $0,003 \cdot 1000 \cdot 24 \cdot 365 / 1000 = 26,28$  кг.

Что составит около 14 тыс. долл. в год при цене галлия 540 долл. за кг. Если же увеличить скорость обработки карьерных вод (что будет являться естественным следствием внедрения технологической схемы по обработке карьерных вод) это даст гораздо большие количества конечного продукта (галлия) и большой экономический эффект.

При производительности обработки в 200 м<sup>3</sup>/сут экономический эффект по галлию составит 118 тыс. долл. в год.

К сожалению, на данном этапе нет сведений по содержанию индия в карьерных водах указанном месторождении, поэтому расчет экономического эффекта от добычи индия пока не представляется возможным.

По оценке производителей галлия, в 2008 году средний уровень цен на галлий удержится на высоком уровне благодаря спросу со стороны производителей автомобилей с гибридными двигателями и светодиодам. Также среди крупных сфер потребления галлия, где, по-видимому, наблюдается наибольший рост спроса, выделяется рынок микроволновых элементов, особенно для мобильных телефонов.



# **СОЗДАНИЕ ЛАБОРАТОРИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩЕЙ КОМПЛЕКСНЫЕ БИОИСПЫТАНИЯ ВЕЩЕСТВ И ПРЕПАРАТОВ НА ПРИСУТСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ**

Савина Александра Сергеевна

*Тихоокеанский институт биоорганической химии*

*690049 г. Владивосток, ул. Русская, 52, кв. 92.*

*e-mail: assavina@mail.ru*

## **Аннотация**

В рамках проекта предлагается создание на базе ТИБОХ ДВО РАН (Тихоокеанский институт биоорганической химии) лаборатории, осуществляющей комплексные биоиспытания веществ и препаратов на присутствие различных видов противоопухолевой активности с использованием культур клеток человека, а также определение цитотоксической активности веществ по отношению к нормальным клеткам.

## **Введение**

Проблема опухолевых заболеваний является одной из острейших проблем современного здравоохранения. Рак (злокачественные опухолевые заболевания) является одной из основных причин смерти в мире. По данным ВОЗ в 2005 г. от рака умерло 13 % от общего числа умерших людей. За последние 25 лет заболеваемость раком выросла в 1,5-2,0 раза, а к 2030 году по прогнозам вырастет втрое, причем особенно тревожно положение в развитых странах. Для различных разновидностей рака характерна одна общая черта – эти болезни чрезвычайно трудно излечить. Следует признать, что лечение рака в настоящее время высокочрезвычайно и сравнительно малоэффективно. В то же время считается, что до 40% случаев заболевания раком можно предотвратить с помощью здорового рациона питания, физической активности и воздержания от употребления табака. Кроме того, профилактика рака может включать употребление различных продуктов и биопрепаратов, содержащих вещества, тормозящие канцерогенез (антиканцерогены или антиопухолевые вещества). Кроме использования в составе профилактических препаратов, антиканцерогенные соединения могут быть перспективными для создания на их основе средств лечения широкого круга онкологических заболеваний.

В связи с вышесказанным в настоящее время по всему миру активно идёт поиск и биоиспытания веществ, обладающих противораковыми свойствами. Такие биоиспытания за рубежом, в частности в США, проводятся на культурах раковых, а также нормальных клеток человека и некоторых животных. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с испытаниями на животных, так как биоиспытания на клеточных культурах – это более дешёвый, быстрый, простой и гуманный способ, требующий всего лишь нескольких миллиграммов вещества для исследования. Также одновременное проведение тестирования на опухолевых и нормальных клетках позволяет спрогнозировать целесообразность выполнения дальнейших более дорогостоящих и длительных биоиспытаний (в том числе клинических).

При всём этом в России до сих пор отсутствует эффективная и налаженная система комплексного биоиспытания веществ на наличие противоопухолевой активности. Подобные исследования и описанные ниже методы их проведения являются новыми для нашей страны.

### **Характеристика проекта**

В рамках проекта планируется общая модернизация недавно созданной в ТИБОХ ДВО РАН (Тихоокеанский институт биоорганической химии) лаборатории, проводящей биоиспытания веществ на клеточных культурах, а также создание налаженной системы комплексного биоиспытания любых растворимых в воде, ДМСО или этаноле (или их смесях) веществ на наличие различных видов противоопухолевой активности. Биоиспытания веществ будут проводиться на заказ.

В настоящий момент среди методов, которыми располагает лаборатория, находятся MTS-метод определения цитотоксичности, метод изучения апоптоза и влияния исследуемых веществ на клеточный цикл с использованием проточного цитометра, метод мягкого агара для определения антиканцерогенной (канцерпревентивной) активности, метод определения воздействия исследуемого вещества на некоторые MAP-киназы с использованием генетически трансформированных клеток, люциферазный метод изучения влияния веществ на p53, AP-1 и NF-kB-зависимую транскрипционную активность в мышинных JB6 Cl 41 клетках.

Кроме того, в лаборатории создана коллекция из 27 клеточных линий, включающей опухолевые клетки человека и нормальные и трансфектные клетки мыши: HL-60, THP-1, Jurkat, P116, P116.cl39 (лейкемия); DLD-1, HCT-15, HCT-116, HT-29, SNU C-4 (рак кишечника); SK-MEL-5, SK-MEL-28, SK-MEL-31, HTB-66

(меланома), HeLa (рак шейки матки); MDA-MB-231 (рак молочной железы), мышинные эмбриональные фибробласты JNK w/t, JNK1<sup>-/-</sup>, JNK2<sup>-/-</sup>; мышинные эпидермальные клетки JB6 Cl 41 P<sup>+</sup>, и их стабильные трансфектанты JB6 ERK2 DNM, JB6 p38, JB6 JNK1 DNM, JB6 RAS DNM, JB6 Cl 41 p53, JB6 Cl 41 NF-κB, JB6 Cl 41AP-1.

На данный момент техническое и кадровое оснащение лаборатории позволяет:

1) Определять цитотоксичность веществ (IC<sub>50</sub>) по отношению к некоторым типам опухолевых клеток человека и одному типу мышинных эпидермальных клеток (цитотоксическая активность).

2) Определять концентрацию вещества (INCC<sub>50</sub>), предотвращающую опухолевую трансформацию JB6 Cl 41 P<sup>+</sup> клеток (канцерпревентивная активность).

3) Определять концентрацию вещества (INCC<sub>50</sub>), при которой останавливается рост колоний раковых клеток (терапевтическая противораковая активность).

4) Определять МАРК-сигнальный путь действия исследуемого вещества.

5) Определять тип индуцируемой веществом гибели клеток (некроз или апоптоз), а так же некоторые особенности пути индукции гибели в случае апоптоза.

6) Определять воздействие веществ на транскрипционную активность, зависимую от некоторых ядерных факторов.

В рамках реализации проекта планируется:

1) Приобретение оборудования и реактивов для запуска метода Western-blotting – одного из основных методов установления молекулярных механизмов действия веществ. Это позволит проводить исследования на качественно более высоком уровне.

2) Приобретение оборудования и реактивов для запуска метода ДНК-лестницы – метода изучения апоптоза, дополняющего метод проточной цитометрии.

3) Расширение имеющейся коллекции клеток – приобретение в организации АТСС (American Type Culture Collection) новых важных типов опухолевых клеток (рак предстательной железы, рак лёгких, рак печени и др.), а также нормальных клеток человека. Приобретение новых линий опухолевых клеток позволит расширить спектр предлагаемых нами биоиспытаний. Приобретение линий нормальных клеток даст возможность оценивать перспективность исследуемого вещества как потенциального лекарственного средства и давать рекомендации о целесообразности дальнейших его испытаний, определять его токсичность.

4) Обучение сотрудников лаборатории новым методам клеточной биологии и биоиспытаний на культурах клеток. Обучение включает приобретение учебно-

научной литературы и стажировки в зарубежных институтах, уже работающие по описанным направлениям. Обучение сотрудников необходимо для эффективной работы с новыми методами, а также для грамотной интерпретации получаемых результатов.

5) Исследования противоопухолевой активности некоторых перспективных природных веществ, выделенных в ТИБОХ ДВО РАН и публикация результатов в международных научных журналах соответствующего профиля. Научные исследования, проведённые с использованием описанных методов, станут ярким показателем эффективности предлагаемой системы биоиспытаний.

Всё это повысит качество и расширит спектр предлагаемых услуг, сделает создаваемое предприятие более привлекательным для потенциальных заказчиков.

После описанной модернизации лаборатории и выполнения в ней ряда научных исследований организуется само предприятие – производится процедура его регистрации, далее на договорной основе у ТИБОХ ДВО РАН арендуется часть оборудования лаборатории и начинается непосредственное выполнение вышеописанных исследований на заказ.

### **Прогнозируемый результат проекта**

В настоящее время высок спрос на проведение описанных выше исследований противоопухолевой и цитотоксической активности веществ и препаратов. Заказчики таких исследований – это крупные и мелкие компании, занимающиеся созданием и продвижением на рынок лекарств и биологически активных добавок, разработкой и производством косметики, бытовой химии, производящие продукты питания. Кроме того, найденные противоопухолевые свойства препарата (например, если такое свойство является сопутствующим эффектом производимой общеукрепляющей БАД) является очень хорошим и важным пунктом в рекламе препарата. В то же время ни одна государственная или коммерческая лаборатория в России не имеет возможности проводить описанные выше комплексные исследования веществ на противоопухолевую активность. В этом смысле на российском рынке сбыта продукции (услуг) конкуренты отсутствуют.

Ближайшее место проведения подобных испытаний – Южная Корея, однако даже там нет практики проведения таких исследований на заказ. Существующие в США схемы биоиспытаний эффективны, но они не охватывают тот комплекс методов, который предлагаем мы, проведение же самих исследований обходится заказчику очень дорого, а, кроме того, их не всегда удаётся выполнить оперативно

из-за некоторых возникающих проблем с законодательством. При всём этом заинтересованным в испытаниях веществ и препаратов компаниям в финансовом, юридическом и научном плане всегда выгоднее заказать исследование, чем самим создавать и поддерживать собственную клеточную лабораторию биоиспытаний.

Цены на заказ исследований будут ниже, нежели за рубежом. Кроме того, одна из основных привлекательных характеристик создаваемой организации – возможность одновременного комплексного исследования вещества или препарата.

Из всего выше сказанного следует, что предлагаемый проект экономически выгоден, а предлагаемые нами услуги являются новым для России и востребованным на Российском (в первую очередь) и международном рынках.

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО БЕЛКА - ПОРИНА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS***

Сидорова Ольга Вениаминовна

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН*

*Владивосток-22, 690022, проспект 100-летия Владивостока, 159*

*e-mail: olga\_ximik@mail.ru*

### **Краткая аннотация**

Проект направлен на решение прикладных задач биохимии и медицины, связанных с биотехнологическим получением бактериального белка - порина *Yersinia pseudotuberculosis*, на основе которого могут быть сконструированы новые эффективные диагностические препараты и разработана тест-система для дифференциальной диагностики различных форм псевдотуберкулёза.

### **Введение**

**Актуальность направления исследования.** Псевдотуберкулёз – острое инфекционное заболевание, протекающее с поражением многих органов и систем человека в виде выраженной лихорадки, экзантемы, лимфаденопатии, артралгии, абдоминального синдрома, сепсиса (в тяжёлых случаях). Для псевдотуберкулёза характерны длительное сохранение возбудителя заболевания в организме, незавершённость патологического процесса, нарушение работы иммунной системы. Проблема неблагоприятных исходов псевдотуберкулёзной инфекции связана с

выраженной аутоенсибилизацией организма, при которой иммунопатологические процессы начинают превалировать над инфекционными, что приводит к развитию так называемых вторично-очаговых форм псевдотуберкулёза. В связи с вышесказанным своевременная диагностика заболевания при наличии широчайшего спектра клинических симптомов, поражения многих органов, склонности к затяжному рецидивирующему течению псевдотуберкулёза, остаётся актуальной задачей для практической медицины. Диагностические тесты, используемые практическим здравоохранением для выявления псевдотуберкулёза, не имеют достаточной специфичности, так как коммерческие диагностикумы сконструированы на основе типоспецифических антигенов. Описанные в литературе современные методы диагностики (иммунофлуоресцентный анализ, полимеразная цепная реакция), недоступны большинству клинических лабораторий. Применение рекомбинантных белков или синтетических пептидов в качестве компонентов диагностических тест-систем позволяет повысить их чувствительность и специфичность, избежать неспецифической гипердиагностики. В связи с этим предлагается использовать рекомбинантный порин из наружной мембраны псевдотуберкулёзного микроба для выявления различных форм псевдотуберкулёза.

**Новизна применяемых подходов.** Биотехнологическое направление сегодня является одним из самых перспективных в области создания биологически активных веществ. Ежегодно в мире продается более чем на 30 млрд. долларов США препаратов, полученных при помощи биотехнологии: лекарств, вакцин, диагностикумов. Производство рекомбинантных препаратов значительно дешевле, чем получение аналогичных препаратов из биологического сырья, которое, кроме того, может служить источником инфекционных агентов и токсинов.

### **Описание и обоснование предлагаемой схемы**

Ранее в Лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН была разработана иммуноферментная (ИФА) тест-система для диагностики псевдотуберкулёза на основе видоспецифического антигена – порообразующего белка (иерсинина), изолированного из наружной мембраны возбудителя псевдотуберкулёза *Y. pseudotuberculosis*. ИФА на основе иерсинина позволяет определять в сыворотках крови больных антитела ко всем серовариантам *Y. pseudotuberculosis* как на ранних стадиях инфекционного процесса (7 – 10 дней от начала проявления клинических признаков), так и в сыворотках крови людей с некоторыми хроническими

заболеваниями, которые можно расценивать как вторично-очаговые формы псевдотуберкулёза. В этой же лаборатории был разработан способ выделения рекомбинантного порина, экспрессированного в виде телец включения в клетках *Escherichia coli*. Было установлено, что использование рекомбинантного белка как антигена в ИФА тест-системе для диагностики острых и хронических форм псевдотуберкулёза повышает эффективность обнаружения специфических антител в сыворотках крови больных людей в среднем в 1,3 раза по сравнению с использованием иерсинина. Мы предлагаем использовать рекомбинантный порин, -видоспецифический, иммунодоминантный белок наружной мембраны псевдотуберкулёзного микроба, в качестве антигена для производства диагностической тест-системы для выявления специфических антител к псевдотуберкулёзному микробу в сыворотках крови больных различными клиническими формами псевдотуберкулёза. Для выполнения задач, поставленных в проекте, необходимы значительные количества рекомбинантного белка, которые будут получены в результате экспрессии кодирующей последовательности гена OmpF-подобного порина наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* в клетках *E. coli* и дальнейшей экстракции рекомбинантного порина из телец включения. Будут отработаны параметры диагностической тест-системы, такие как количество наносимого на планшет антигена, реагенты для инактивации неспецифического связывания, время проведения анализа.

### **Прогнозируемый результат проекта**

*Y. pseudotuberculosis* имеет значительный ареал распространения в России (Северо-Западный район, Поволжье, Сибирь, Якутия, Дальний Восток). Фактическая заболеваемость псевдотуберкулёзом зачастую превышает официально зарегистрированную. Клиническая диагностика этого заболевания затруднена в связи с поздним бактериологическим подтверждением диагноза (высеваемость иерсиний из биологического материала составляет в различных областях от 0 до 2,4%) или же вообще его отсутствием

Выпускаемые в настоящее время в России иммунологические тест-системы для диагностики псевдотуберкулёза сконструированы на основе липополисахаридов и специфичны для каждого серовара. Для серодиагностики псевдотуберкулёза предлагается использовать также белки, связанные с патогенезом иерсиний. Однако надо отметить, что отдельные штаммы различаются по набору этих белков. Это приводит к тому, что в состав диагностического антигена должно входить несколько

белков. В связи с вышесказанным весьма перспективным представляется использование продукта консервативного хромосомного гена – рекомбинантный порообразующий белок из наружной мембраны псевдотуберкулёзного микроба, для создания видоспецифических диагностических препаратов.

Тест-система на основе рекомбинантного порина востребована в диагностических лабораториях различных медицинских учреждений. Метод ИФА достаточно прост, не требует применения дорогостоящих реактивов и сложного оборудования. Положительный экономический и социальный эффект в результате применения тест-системы на основе рекомбинантного порина заключается в следующем:

- 1) значительно сокращается время, необходимое для наработки рекомбинантного белка по сравнению с порином, изолированным из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* (3 дня и 7 дней, соответственно);
- 2) за счёт сокращения времени и материальных затрат на производство рекомбинантного белка, конечный продукт имеет более низкую себестоимость;
- 3) увеличивается выход конечного продукта: из 1 г микробной массы трансформированных клеток *E. coli* получают 200 мг рекомбинантного белка (для сравнения: из 1 г микробной массы *Y. pseudotuberculosis* получают 20 мг изолированного порина);
- 4) в 50 раз увеличивается число образцов крови больных, которые могут быть проанализированы с помощью тест-систем, произведённых с использованием вышеуказанного количества порина, по сравнению с нативным порином.



**Научное издание**

**Материалы молодежной секции  
«Актуальные проблемы химии и биологии»  
1st Far-Eastern International Symposium  
on Life Sciences**

**Часть II**

Материалы опубликованы в авторской редакции

Ответственный за выпуск:

к.х.н. А.А. Ведягин

Компьютерная верстка:

к.х.н. А.А. Ведягин

к.х.н. А.В. Матвеев

Подписано в печать 30.07.2008. Заказ № 96.  
Формат 60x90/8. Усл. печ. л. 6. Тираж 160 экз.  
Типография Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН