

КРИПТОГАМНАЯ ФЛОРА ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ: ФИТОХИМИЧЕСКИЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Наземная флора Антарктики представлена криптогамной растительностью — лишайниками, мохообразными и в меньшей степени — водорослями. Именно они являют собой манифестацию жизни на свободных ото льда участках суши самого сурового континента планеты.



Высокая адаптивная способность криптогамов в экстремальных условиях — веское основание для исследований не только молекулярных механизмов их феноменальной устойчивости. Считается, что биологически активные соединения, определяющие толерантность криптогамной флоры, обладают значительным фармакологическим потенциалом. Отмечается всплеск научного интереса к исследованиям этих свойств представителей лишайнобиоты и бриофлоры с целью создания на этой основе лекар-

ственных средств различного назначения. Однако антарктические криптогамы остаются почти не изученными в силу их малодоступности.

Фактически в Институте экспериментальной ботаники НАН Беларуси впервые инициированы исследования фитохимического и фармацевтического потенциала криптогамной флоры Восточной Антарктики — лишайников и мхов, собранных в ходе белорусских антарктических экспедиций.

Необходимо отметить, что погодные условия в регионе, в котором располагается Белорусская антарктическая станция «Гора Вечерняя», весьма суровы. Тем не менее лишайники и мхи способны выживать и в таких условиях. При этом соотношение биполярных и эндемических видов, то есть собственно антарктических, среди лишайников приблизительно одинаковое, тогда как среди мхов преобладают биполярные. Однако наличие таковых среди лишайников и мхов в Антарктике позволяет более широко использовать аналогичное растительное сырье, имеющееся в Беларуси.

Уже в первый год исследований (2022 г.) в рамках задания 8 подпрограммы 2 «Развитие деятельности белорусской антарктической станции» ГП «Научно-инновационная деятельность Национальной академии наук Беларуси на 2021–2025 гг.» нами проанализированы представители ряда семейств антарктических лишайников и мхов по различным биохимическим и медико-биологическим показателям.

Изучение столь уникальных объектов проводилось с помощью современных

методов омикс-технологий с привлечением хромато-масс-спектрометрии, а также методов биоинформатики, клеточной биологии и других, находящихся на стыке различных областей науки, таких как метаболомика, биохимия, биоинформатика, молекулярная биология, клеточная биология и др. Нами проанализирован метаболом образцов лишайников и мхов, проведены биохимические исследования важных для физиологии криптогамов показателей активности специфических белков и ферментных систем (гликопротеинов семейства лектинов, антиоксидантной защиты, ингибиторов протеиназ, тирозиназы), что имеет большое значение и для фармакологической оценки растительного сырья. Кроме того, изучалось влияние субстанций, полученных из лишайников и мхов, на жизнеспособность опухолевых клеток меланомы человека и вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. С помощью биоинформационных подходов идентифицированы потенциальные высокоэффективные ингибиторы, относящиеся к классу полифенольных соединений, проявляющих высокую аффинность связывания с интерфейсом взаимодействия белка S SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2.

Известно, что метаболом – это совокупность всех метаболитов биологического объекта (органеллы, клетки, ткани, органы и целый организм). На экологическом уровне можно говорить и о метаболоме популяции. Следует обозначить, что данное понятие – это своего рода отражение состояния биообъекта в данный момент времени, функция генома, транскриптома и протеома.

Научное направление «метаболомика» ориентировано на исследование биохимических процессов, связанных с органическими молекулами относительно небольшого размера и массой, как правило, до 1500 Да. К ним относятся субстраты, интермедиаты и конечные продукты клеточного метаболизма, превращений веществ с участием ферментов и ферментных систем. Изучение метаболома различных организмов – бурно развивающаяся область знаний вследствие того, что информация о количественном и качественном составе пула низкомолекулярных биорегуляторов важна для понимания механизмов функционирования организма в норме и при патологии, а также потому, что очень часто соединения, выделенные из природных источников, обладают уникальными свойствами, важными с точки зрения применения их в народном хозяйстве. В частности, исследование метаболома – первый шаг на пути создания нового высокоэффективного лекарственного препарата.

Гликопротеины семейства лектинов – это белки неиммунной природы, характерной структурной особенностью которых является наличие в молекулах специфических углеводсвязывающих сайтов, принимающих участие в формировании белок-углеводных взаимодействий и обеспечивающих аффинное связывание с углеводными детерминантами на поверхности клеток. Данное обстоятельство объясняет способность лектинов растений взаимодействовать с различными клетками, например форменными элементами крови, и выступать в качестве агонистов, запускающих агрегацию тромбоцитов, что может быть акту-

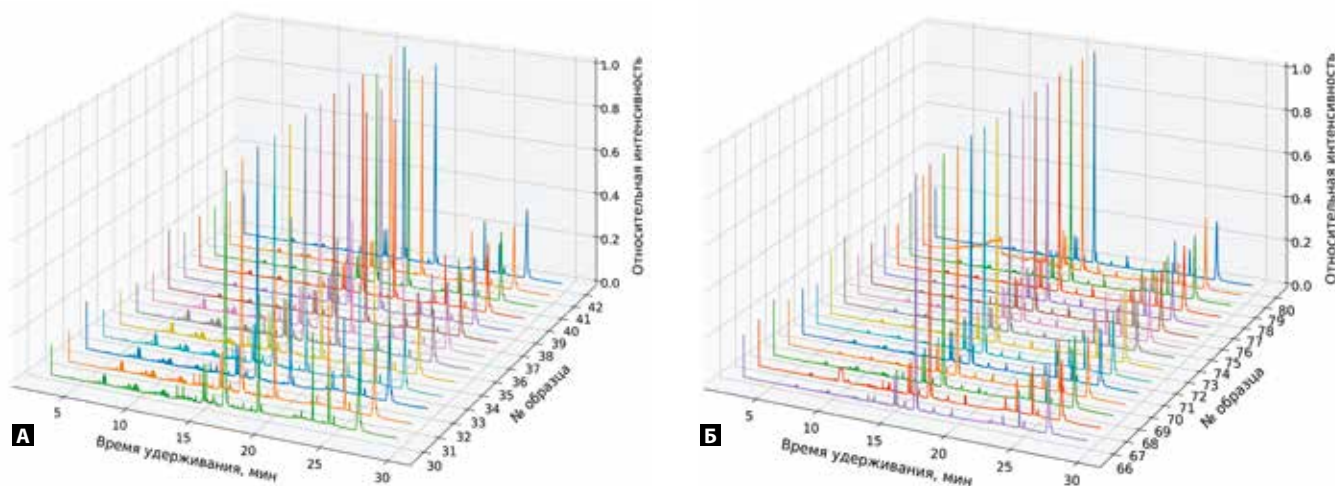


Рис. 1. Типичные хроматограммы ГХ-МС, полученные в результате анализа образцов метаболома лишайников (А) и мхов (Б) Антарктики

ально при разработке гемостатических средств локального применения. Кроме того, фитолектинам свойственно взаимодействовать с опухолевыми клетками.

Медьсодержащий фермент тирозиназа участвует в синтезе пигмента меланина. Данный фермент у лишайников задействован в механизмах защиты при действии абиотических факторов окружающей среды, в частности инсоляции.

Объединение усилий Института экспериментальной ботаники и Института биоорганической химии НАН Беларуси в рамках выполнения работ позволило провести анализ метаболомных профилей 80 образцов различных видов лишайнобиоты и бриофлоры, собранных в районе действия Белорусской антарктической станции. По результатам хромато-масс-спектрометрического анализа в среднем в образцах лишайников идентифицировано 69 соединений, а в образцах мхов – 83. Среди них присутствуют как первичные (спирты, жирные кислоты, амиды и эфиры жирных кислот), так и вторичные метаболиты (бензеноиды, фенольные и полифенольные соединения, стероиды, терпены) лишайнобиоты и бриофлоры Антарктики. Представленные образцы отличались по ряду метаболитов как в пределах вида, так и между ними в зависимости от места произрастания. При этом наибольшие различия между лишайниками и мхами наблюдаются в составе вторичных метаболитов, в частности соединениях класса терпенов. Бензеноиды, в свою очередь, позволяют разделить образцы, относящиеся к разным видам лишайников (рис. 1).

Кроме того, нами в сотрудничестве с Гродненским медицинским университетом были идентифицированы около 40 свободных аминокислот и их производных в составе собранных образцов антарктических лишайников и мхов (рис. 2).

Установлено, что талломы лишайников и мхов характеризовались высокой антиоксидантной активностью и незначительной – ингибиторов протеолитических ферментов, принимающих участие в механизме адаптации, что является также важным фармацевтическим показателем. Впервые в талломах некоторых видов антаркти-

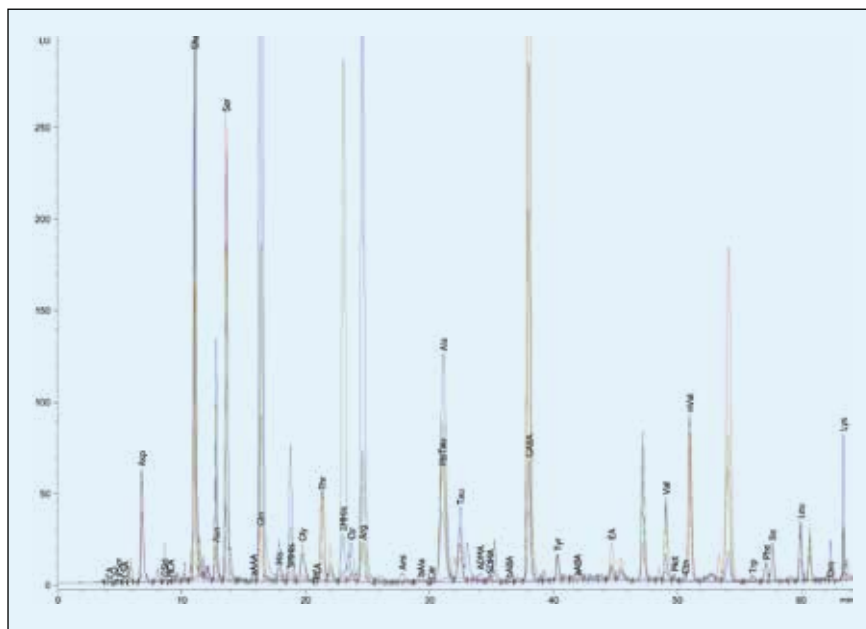


Рис. 2. Типичные профили свободных аминокислот лишайников Антарктики

ческих лишайников определены ингибиторы активности фермента тирозиназы, участвующего в биосинтезе меланина, что является основой для разработки импортозамещающих средств, корректирующих гиперпигментацию кожи при нарушениях метаболизма меланина и перспективных для применения в лечебной косметологии.

Исследования, проведенные совместно с коллегами кафедры биофизики физического факультета БГУ и РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, показали, что субстанции из некоторых видов мхов, в том числе биполярных, обладают не только агглютинирующей активностью в отношении эритроцитов, но и способствуют повышению агрегации тромбоцитов человека, сопоставимую с действием тромбина, независимо от группы крови, резуса и пола доноров. Отмеченный феномен прослеживался в АПТВ-тесте. Полученные результаты позволили расширить спектр перспективных видов мхов, обладающих гемостатической активностью, и использовать их для разработки новых гемостатиков растительного происхождения местного применения.

В сотрудничестве с РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с помощью метода проточной цитометрии с применением проточного цитофлуориметра установлено цитотоксическое действие субстанции одного из антарктических лишайников

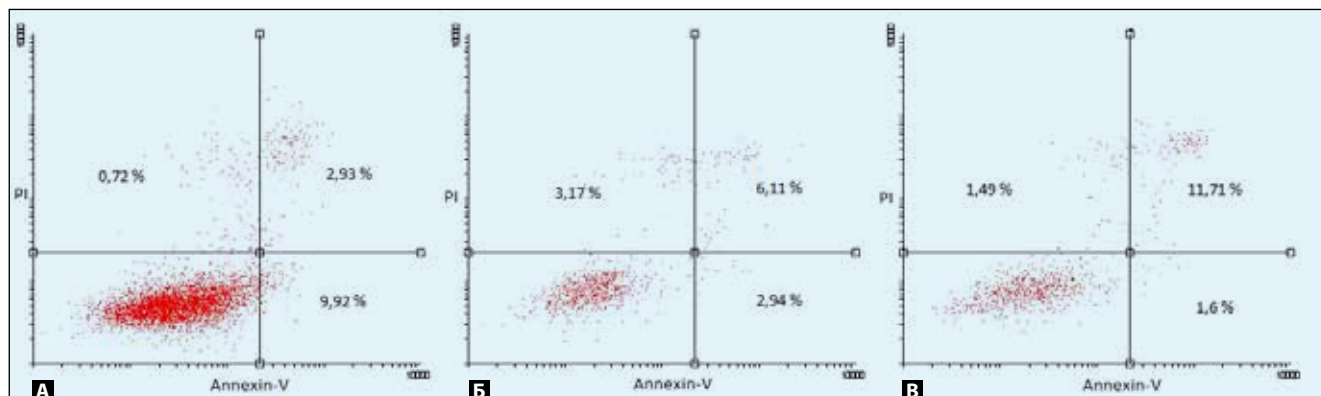


Рис. 3. Апоптоз клеток MeWo (клеточная линия меланомы) под действием субстанций, выделенных из антарктических лишайников: **А** – отрицательный контроль (без субстанций); **Б** – субстанция 2 (10% от объема среды); **В** – положительный контроль (цисплатин, 5 мкг/мл). Измерение параметров клеточной гибели проводили путем проточной цитометрии (Beckman Coulter Cytomics FC 500) после мечения клеток Annexin-V и PI (Exbio). Данные проанализированы с помощью программы Flowing Software. Правый нижний квадрант (Annexin-V+) – ранний апоптоз, оба верхних (PI+, Annexin-V+ PI+) – поздний апоптоз/некроз, левый нижний – живые клетки

в отношении клеточной линии меланомы человека MeWo, сопоставимое с противоопухолевым лекарственным средством цисплатин (рис. 3).

В результате проведенного в Институте биорганической химии НАН Беларуси виртуального скрининга молекулярной библиотеки, включающей 250 соединений метаболитов лишайно-

биоты и бриофлоры, идентифицированы шесть молекул, относящихся к классу полифенольных соединений, которые проявляют высокую аффинность связывания с интерфейсом взаимодействия белка S SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2. Анализ статических и динамических моделей комплексов лиганд/S/ACE2 свидетельствует о том, что все найденные соединения способны эффективно блокировать взаимодействие белка S SARS-CoV-2 с ACE2, о чем свидетельствуют более низкие значения свободной энергии связывания по сравнению с величиной, предсказанной с помощью идентичного вычислительного протокола для мощного ингибитора проникновения SARS-CoV-2 этравирина. Показано, что химическое средство этих соединений к интерфейсу S-ACE2 обеспечивается главным образом ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями с функционально важными остатками белка S и рецептора ACE2, которые выполняют роль «горячих точек» связывания, помогающих этим молекулам эффективно взаимодействовать с терапевтической мишенью (рис. 4).

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что идентифицированные молекулы формируют перспективные базовые структуры для разработки новых эффективных препаратов против COVID-19 – ингибиторов проникновения SARS-CoV-2. Данный подход позволил отобрать виды лишайников с характерной особенностью – присутствием некоторых из предсказанных выше фенольных соединений, проявляющих высокую аффинность

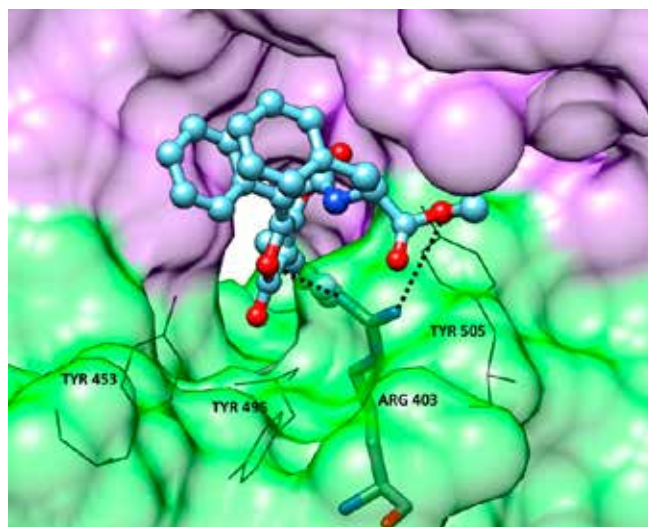


Рис. 4. Структурный комплекс ACE2-RBD субъединицы S1 белка S SARS-CoV-2 в комплексе с лучшим, согласно данным молекулярного моделирования, потенциальным ингибитором интерфейса взаимодействия ACE2-RBD SARS-CoV2 среди исследованных метаболитов лишайников. Лиганд изображен с помощью модели «шарик-палочка-шарик». Приведены аминокислотные остатки RBD S1 белка S вируса SARS-CoV-2, участвующие в межмолекулярных взаимодействиях с лигандом. Водородные связи показаны пунктирными линиями

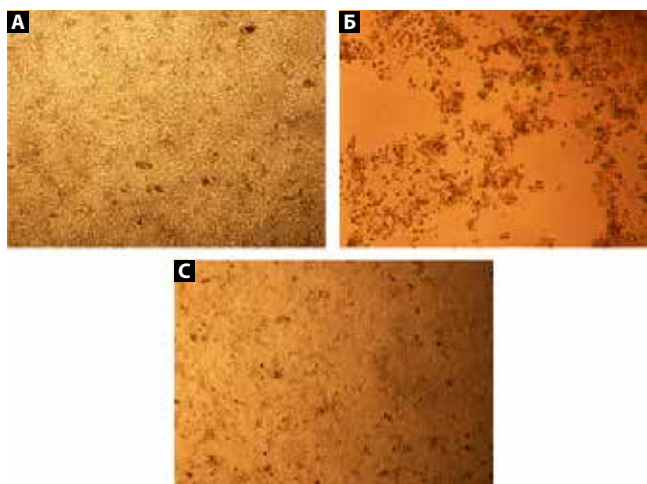


Рис. 5. Результаты оценки противовирусной активности образца гликопротеина семейства лектинов представителей лишено-биоты Антарктики в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6: **А** – контроль культуры клеток; **Б** – контроль культуры с вирусом SARS-CoV-2; **С** – культура клеток, инфицированная вирусом SARS-CoV-2, в присутствии исследуемого образца. Изображения сделаны с помощью инвертированного микроскопа NIKON Eclipse TS100-F (увеличение 4х)

связывания с интерфейсом взаимодействия белка S SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2.

Совместно с РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в экспериментах *in vitro* нами показано, что выделенные из талломов отобранных видов антарктических лишайников субстанции, содержащие предсказанные соединения, эффективно подавляли жизнеспособность вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero E6 по сравнению с контрольной группой (рис. 5).

Следует отметить, что перечисленные выше эффекты были характерны для выделенных нами субстанций из биполярных лишайников и мхов Антарктики, и в Беларуси мы обнаружили эти же виды.

Таким образом, криптогамная флора Ледового континента характеризуется широким спектром биологически активных соединений, определяющих ее значительный фармацевтический потенциал: высокую антиоксидантную и антигиперлипидемическую активность; противоопухолевое действие в отношении меланомы человека; противовирусное – к коронавирусу SARS-CoV-2. Важно отметить, что полученные результаты перспективны для разработки отечественных фитопрепаратов различного назначения с использованием белорусских биполярных видов лишайников и мхов в качестве растительного сырья. ■

Ольга Канделинская,

ведущий научный сотрудник Института экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, кандидат биологических наук, доцент

Елена Грищенко,

старший научный сотрудник Института экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси

Алексей Янцевич,

директор Института биоорганической химии НАН Беларуси, кандидат химических наук, доцент

Ярослав Диченко,

ведущий научный сотрудник Института биоорганической химии НАН Беларуси, кандидат химических наук

Александр Андрианов,

главный научный сотрудник Института биоорганической химии НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор

Юрий Корноушенко,

старший научный сотрудник Института биоорганической химии НАН Беларуси, кандидат химических наук

Евгений Дорошенко,

доцент кафедры биохимии Гродненского медицинского университета, кандидат медицинских наук

Элеонора Дашкевич,

заведующая лабораторией трансфузиологии РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, кандидат медицинских наук, доцент

Дарья Григорьева,

доцент кафедры биофизики физического факультета БГУ, кандидат биологических наук

Татьяна Дорошенко,

заведующая онкологическим отделением клеточных технологий РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова

Елена Гасич,

заведующая лабораторией диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, доктор биологических наук, доцент

Ольга Залевская,

научный сотрудник РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Авторы благодарят за помощь в работе Д. Горещкого (Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси), И. Горудко (кафедра биофизики физического факультета БГУ), Н. Бухвальд (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий), Н. Боброву и И. Северина (РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова), А. Дееву (Центральный ботанический сад НАН Беларуси), Ю. Гигиняка и Е. Корзуну (НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам).