

**МАТЕРИАЛЫ
ФОРУМА**

**FORUM
PROCEEDINGS**



МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL FORUM

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:
СОСТОЯНИЕ
И ПЕРСПЕКТИВЫ
РАЗВИТИЯ**

**BIOTECHNOLOGY:
STATE OF THE ART
AND PERSPECTIVES**

**23 - 25 МАЯ 2018
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4**

**23 - 25 MAY, 2018
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW**

UDC 577.15

SINGLE-DOMAIN MAGNETIC NANOPARTICLES AS MEDIATORS OF LOCAL DEFORMATIONS OF IMMOBILIZED ON ITS SURFACE MACROMOLECULES

Veselov M.M.¹, Leontyev S.A.¹, Efremova M.V.^{1,2}, Uporov I.V.¹, Majouga A.G.^{3,2,1}, Kabanov A.V.^{1,4}, Golovin Yu.I.^{1,5}, Klyachko N.L.¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia

² National University of Science and Technology "MISIS" (MISIS), Moscow, Russia

³ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

⁴ University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

⁵ G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

e-mail: veselov.mac@gmail.com

The mechanism of α -chymotrypsin immobilized on single-domain core@shellFe₃O₄@Au nanoparticles activity changes under 50 Hz magnetic field was studied. As shown, the catalytic activity dropped down due to the changes occurred in the structure of the enzyme binding site caused by the mechanical rotational vibrational or translational vibrational motions of nanoparticles.

Keywords: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, Brownian relaxation, immobilized enzymes

Recently, there has been a significant increase in publications related to the application of magnetic nanoparticles (MNPs) for nanomedicine and biotechnology. In connection with this, we previously theoretically demonstrated the "nanomechanical" approach [1] to the control of biochemical reactions on the surfaces of single-domain MNPs in a low-frequency magnetic field. In this approach, superparamagnetic nanoparticles are used as mediators of local deformations of biomacromolecules attached to them. We synthesized carboxylated and aminated Fe₃O₄@Au core@shell magnetic nanoparticles that were cross-linked by α -chymotrypsin molecules. As a result of the action of alternating 50 Hz and 140 mT magnetic field (AMF) we observed a significant decrease in enzymatic activity caused by a decrease of the size of the enzyme binding site. The data obtained are confirmed by the results of molecular modeling and kinetic analysis.

The work was supported in part by RSF-14-13-00731 and RFBR 17-54-33027 grants and M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development.

References:

1. Golovin Yu.I. et al. Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules // *Phys. of the Solid State*. 2014. Vol. 56. №7. P. 1342–1351

УДК 577.152.192.31; 547.99

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ДЕГИДРОКВЕЦЕТИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

М.Е. Хлупова¹, И.С. Васильева¹, Г.П. Шумакович¹, О.В. Морозова¹, Е.А. Зайцева², В.А. Чертков², А.К. Шестакова³, А.В. Кисин³, К.В. Лисицкая¹, А.И. Ярополов¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

119071, Москва, Ленинский проспект, 33;

² МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

119991, Москва, Ленинские горы, 1/3;

³ Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, Россия, 105118, Москва, шоссе Энтузиастов, 38

e-mail: ezaitseva2008@gmail.com

Разработан метод окислительной полимеризации дегидрохверцетина (ДГК) с участием билирубиноксидазы *Myrothecium verrucaria* и лакказы базидиального гриба *Trametes hirsuta*. Продукты полимеризации ДГК охарактеризованы методами УФ-видимой, FTIR и ЯМР ¹H и ¹³C спектроскопии. Найдено, что олигомеры ДГК обладают повышенной термостабильностью и антиоксидантной активностью по сравнению с мономером.

Ключевые слова: лакказы, билирубиноксидаза, дигидрокверцетин, окислительная полимеризация, антиоксидантная активность

Дигидрокверцетин (таксифолин, ДГК) относится к природным флавоноидам и имеет широкий спектр фармакологического действия: он проявляет антиоксидантные, ангиопротекторные, гепатопротекторные, противоопухолевые и другие свойства, кроме того ДГК обладает регуляторными свойствами и может контролировать репарацию ДНК, апоптоз, митохондриальный биогенез, а также регулировать активность различных ферментов. Однако, многие флавоноиды, включая ДГК, быстро разлагаются в организме, в то время как их относительно высокомолекулярные производные, имеют большее время жизни *in vivo*, что указывает на необходимость поиска новых производных ДГК.

В настоящей работе предложен метод синтеза олигомеров ДГК с участием многоядерных медьсодержащих оксидаз: билирубиноксидазы (БОД) *Myrothecium verrucaria* и лакказы (ЛК) базидиального гриба *Trametes hirsuta*. При выбранных условиях синтезированные олигомеры ДГК были получены с хорошим выходом (более 30%). Продукты окислительной полимеризации ДГК охарактеризованы методами УФ-видимой, FTIR и ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопии. В зависимости от используемой оксидазы продукты полимеризации ДГК имели отличающиеся физико-химические характеристики. Найдено различие в структурах олигомеров ДГК, полученных с использованием ЛК и БОД. В результате ЯМР исследований было показано, что олигомеры ДГК, синтезированные с участием БОД, имеют нерегулярную структуру. По сравнению с мономером олигомеры ДГК, синтезированные с использованием обоих ферментов, имели более высокую термостабильность. Антиоксидантную активность определяли как концентрацию олигомеров ДГК или мономера ДГК, необходимую для уменьшения начальной концентрации 1,1'-дифенил-2-пикрилгидразил радикала DPPH• на 50%. Для олигомеров, синтезированных с участием БОД, наблюдали повышение антиоксидантной активности в 2,5 раза по сравнению с исходным мономером.

Для повышения эффективности синтеза олигомеров изучали возможность многократного использования фермента. Показано, что лакказа, включенная в гидрофобную ионную жидкость (1-бутил-2-метилимидазолий гексафторфосфат), может быть многократно использована для биотрансформации ДГК. Физико-химические характеристики олигомеров ДГК, синтезированных с участием иммобилизованного фермента, не отличались от характеристик олигомеров, полученных с нативной лакказой. Сравнительное исследование антиоксидантной активности мономеров и олигомеров ДГК проводили на культуре клеток почки собаки МДСК1. Для детекции свободных радикалов использовали 2',7'-дихлорфлуоресцеин ацетат (ДХФА). Установлено, что олигомеры ДГК обладали более выраженными антиоксидантными свойствами по сравнению с мономером.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 17-04-0037а и № 14-04-00403а.

UDC 577.152.192.31; 547.99

OXIDATIVE POLYMERIZATION OF DEHYDROQUERCETIN FOR PRODUCTION OF NEW COMPOUNDS WITH IMPROVED PHARMACEUTICAL PROPERTIES

M.E. Khlupova ¹, I.S. Vasil'eva ¹, G.P. Shumakovich ¹, O.V. Morozova ¹, E.A. Zaitseva ², V.A. Chertkov ², A.K. Shestakova ³, A.V. Kisin ³, K.V. Lisitskaya ¹ and A.I. Yaropolov ¹

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Leninskii pr. 33, 119071, Moscow, Russia;*

² *M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie Gory 1/3, 119991, Moscow, Russia;*

³ *State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Shosse Entuziastov 38, 105118, Moscow, Russia*

e-mail: ezaitseva2008@gmail.com

A method for oxidative polymerization of dihydroquercetin (DHQ) has been developed. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* and laccase from the basidial fungus *Trametes hirsuta* were applied as catalysts. The products of polymerization were analyzed using UV-vis, FTIR, ^1H и ^{13}C NMR spectroscopy. DHQ oligomers synthesized were found to have higher thermostability and higher antioxidative activity as compared with the monomer.

Key words: laccase, bilirubin oxidase, dihydroquercetin, oxidative polymerization, antioxidative activity

Dihydroquercetin (taxifolin, DHQ) belongs to natural flavonoids and has a wide range of pharmacological effects, in particular antioxidant, angioprotective, hepatoprotective, antitumor and others. Furthermore, DHQ also

shows regulatory properties and can control DNA repair, apoptosis, and mitochondrial biogenesis, as well as it can regulate the activity of certain enzymes. It is known that many flavonoids including DHQ decompose rather quickly in vivo while their relatively high molecular weight derivatives have a longer lifespan. These data show promise for the synthesis of novel DHQ derivatives.

In this work a new method for dihydroquercetin oxidative polymerization has been proposed. Multicopper oxidases, namely, bilirubin oxidase (BOD) from *Myrothecium verrucaria* and laccase (LC) from the basidial fungus *Trametes hirsuta* are used as catalysts. The conditions selected enabled good yields of DHQ oligomers (more than 30%), which were then analyzed using UV-vis, FTIR, ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Depending on the enzyme applied, the products of DHQ polymerization differed in physico-chemical properties, and as shown by NMR studies, had different structures. In particular, the products of BOD-catalyzed DHQ polymerization were found to have an irregular structure. DHQ oligomers synthesized using both enzymes demonstrated higher thermostability as compared with the monomer.

The antioxidant activity of DHQ oligomers and DHQ monomer was defined as the antioxidant concentration which required to decrease the initial concentration of DPPH• (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) by 50%. The significant increase of antioxidant activity (2.5 times) was observed for BOD synthesized DHQ oligomers in comparison with antioxidant activity of DHQ monomer.

To improve the efficiency of biocatalytic synthesis the possibility of enzyme reuse was studied. It was shown that laccase included into hydrophobic ionic liquid (1-butyl-2-methylimidazolium hexafluorophosphate) can be reused for biotransformation of dihydroquercetin. The physico-chemical characteristics of DHQ oligomers synthesized using immobilized into the ionic liquid laccase (LC/IL) did not differ from the characteristics of the oligomers obtained with native laccase. Comparative study of antioxidant activity of DHQ monomer and DHQ oligomers was conducted on dog kidney cell culture (MDCK 1). 2',7'-dihlorofluorestsein diacetate (DHFD) was applied to detect free radicals. It was found that the DHQ oligomers obtained by enzymatic synthesis with immobilized into IL laccase possess more pronounced antioxidant properties as compared with the monomer.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects No. 17-04-00378a and No. 14-04-00403a.

УДК: 604, ББК: 52.5

ПЕРСониФИЦИРОВАННЫЙ БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ РАСТВОРИМОЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ.

И.Р. Гильмутдинова ¹, П.С. Еремин ¹, Н.В. Меньшутина ², Д.Д. Ловская ²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 125047, Москва, Новый арбат, 32, gilm.ilmira@mail.ru, 89686861979

² Международный учебно-научный центр трансфера фармацевтических и биотехнологий Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9, chemcom@muctr.ru,

Разработана оригинальная технология получения персонифицированного биопластического материала на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса (ВМ). В качестве исходных компонентов используются коллаген I типа, гиалуроновая кислота и эластин в соотношениях, равных соотношения в дерме взрослого человека. В качестве биологически активных компонентов (БАК) мы использовали пептиды размером от 10 до 50 кДа, полученные из аутологичных пролиферативно активных фибробластов.

Ключевые слова: персонифицированная медицина, тканеинженерная конструкция, клеточные технологии, коллаген; фибробласты человека; биопластический материал.

Согласно стратегии развития медицинской науки в РФ на период до 2025 года технологии регенеративной медицины, в общем, и биотехнологии, в частности, определены в качестве приоритетных направлений в здравоохранении. В связи с этим в современном здравоохранении интенсивно развивается направление по разработке биоактивных матриц для восстановления утраченных или повреждённых тканевых структур организма человека.

Современный рынок биопластических материалов в основном представлен продуктами децеллюри-