

Скрининг продуцентов ингибиторов 15-липоксигеназы среди микромицетов

М. В. БИБИКОВА¹, И. А. СПИРИДОНОВА¹, А. Н. ДАНИЛЕНКО², Ю. А. КИМ³,
А. Ф. КОРЫСТОВА⁴, В. В. ШАПОШНИКОВА⁴, Ю. Н. КОРЫСТОВ⁴

¹ ООО «ВИОРИН», Москва

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва

³ Институт биофизики клетки РАН, Московская обл., Пущино

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино

Screening of Organisms Producing Inhibitors of 15-Lipoxygenase Among Micromycetes

M. V. BIBIKOVA¹, I. A. SPIRIDONOVA¹, A. N. DANILENKO², YU. A. KIM³,
A. F. KORYSTOVA⁴, V. V. SHAPOSHNIKOVA⁴, YU. N. KORYSTOV⁴

¹ Viorin, Moscow

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow

³ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

⁴ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region

Исследовали влияние экстрактов, выделенных из мицелия грибов *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7 и *Beauveria bassiana* №15 на активность 15-липоксигеназы (15-ЛО), выделенной из ретикулоцитов крыс. Активность 15-ЛО определяли по окислению линолевой кислоты. Показано, что экстракт из мицелиальной массы комплекса грибов ингибирует 15-ЛО (IC₅₀=12 мкг/мл). Ингибирующая 15-ЛО активность комплексного экстракта обусловлена веществами, экстрагируемыми из *Lecanicillium lecanii* №169. Были определены фракции экстракта, ответственные за его активность и идентифицированы соединения, содержащиеся в этих фракциях. Ими оказались во фракции 10 — 4-гидроксibenзойная кислота и 4-гидроксibenзиловый спирт, во фракции 11 — флавоноид генистеин. Рассмотрена возможная роль ингибирования этими соединениями 15-ЛО в антиатеросклеротической активности экстракта грибов.

Ключевые слова: ингибиторы 15-липоксигеназы, микромицеты, 4-гидроксibenзойная кислота, генистеин.

The effects of extracts from the mycelium of *Lecanicillium lecanii* No.169, *Beauveria fellina* No.7 and *Beauveria bassiana* No.15 on the activity of 15-lipoxygenase (15-LO) recovered from rat reticulocytes was investigated. The activity of 15-LO was determined by oxidation of linolic acid. The extract from the mycelium of the fungal complex was shown to inhibit 15-LO (IC₅₀ of 12 mcg/ml). The inhibitory effect of the combined extract on 15-LO was due to the substances recovered from *Lecanicillium lecanii* No.169. The extract fractions responsible for the activity were determined and the compounds containing the fractions were identified. They proved to be 10 — 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxybenzyl alcohol and genistein, a flavonoid from fraction 11. The possible role of the inhibitory effect of the compounds on 15-LO in the antiatherosclerotic activity of the fungal extract is discussed.

Key words: 15-lipoxygenase inhibitors, micromycetes, 4-hydrobenzoic acid, genestein.

Введение

Ранее было установлено, что многие инсектицидные грибы продуцируют соединения с высокой гиполипидемической, кардиотонической, иммуносупрессивной и другими активностями. При проведении поиска продуцентов соединений с гиполипидемической активностью нами были отобраны штаммы *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7, *Beauveria bassiana* №15. Активность проявляли препараты, выделенные из мицелия комплекса этих грибов. Пре-

парат при введении *per os* кроликам с искусственной гиперлипидемией в низких дозах значительно снижали уровень холестерина в крови животных, а также снижали отношение липопротеидов низкой (ЛПНП) и высокой плотности [1]. Наибольшая активность была установлена у штамма *Lecanicillium lecanii* №169. Экстракт мицелия этого гриба при дозе в 100 раз меньшей, чем ловастатин (клинический гиполипидемический препарат), значительно и более пролонгировано снижал уровень холестерина в крови кроликов с искусственной гиперлипидемией [2], а также проявлял высокую антиоксидантную активность [3]. Было также отмечено, что линолевая кислота, исходно содержащаяся в экстракте, не окисля-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. ООО «Виорин»

лась, что позволило предположить наличие в экстракте ингибитора окисления полиненасыщенных жирных кислот.

Подавление окисления ненасыщенных жирных кислот комплексными препаратами из отобранных нами микромицетов может иметь отношение к их антиатеросклеротическому действию. Существует положительная корреляция между окислением ЛПНП и риском сердечно-сосудистых заболеваний [4]. Известно, что количество перекисных продуктов в ЛПНП больных атеросклерозом больше, чем в ЛПНП здоровых [5]. Гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот биологически активны и передают приобретённую активность целой частице ЛПНП. К этой активности относится стимуляция экспрессии адгезивных молекул, колониестимулирующего фактора, моноцитарного хемоаттрактантного белка и др. факторов [6]. Кроме того, перекисно-модифицированные ЛПНП активно захватываются макрофагами [7]. В образовании модифицированных ЛПНП могут участвовать липоксигеназы. В частности, было показано, что 15-липоксигеназа (15-ЛО) ускоряет перекисную модификацию ЛПНП *in vitro* [8]. Показано увеличение экспрессии этого фермента в жировых полосках и атеросклеротических бляшках кролика и человека [9]. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией 15-ЛО в сосудах атеросклеротические повреждения аорты были значительно более выражены [10].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния комплексных экстрактов грибов *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7 и *Beauveria bassiana* №15 на активность 15-липоксигеназы, а также идентификация активных соединений экстрактов.

Материал и методы

Культуры микромицетов выращивали и хранили на агаризованной среде Райстрика. Для оценки биологической активности культуры растили в условиях глубинного культивирования в колбах на 750 мл со 150 мл питательной среды А-9 с круговым вращением 180 об/мин в течение 14 сут. Биомассу микроорганизмов отделяли центрифугированием. Мицелий каждой культуры дважды экстрагировали 5 объемами ацетона в течение 30 мин. Ацетоновые экстракты объединяли и удаляли растворитель до водного остатка. Водный остаток встряхивали в делительной воронке с равным объемом хлороформа и отделяли реэкстракт в хлороформе от водной фазы. Растворитель удаляли на вакуум-выпарной установке (ИР-1) при 45°C.

Методом колоночной хроматографии было проведено разделение экстракта гриба *Lecanicillium lecanii* №169 на отдельные фракции. Размер колонки 1,5:30 (диаметр 1,5 см, высота 30 см). В колонку, заполненную Kieselgel 60 (фирмы Merck) в петролейном эфире вносили препараты — сырцы, растворенные в системе растворителей петролейный эфир—ацетон 4:1. Элюция фракций с колонки проводили системой растворителей петролейный эфир:ацетон (50:1). Фракции очищали методом ВЭЖХ. Степень очистки была не менее 98%.

Физико-химические характеристики компонентов фракций 10 и 11 и их масс-спектры определяли с помощью методов

2D ЯМР(COSY, HSQC, HMBC). Подтверждением правильности установленных структур являлось совпадение рассчитанных и экспериментальных спектров ЯМР.

15-липоксигеназу (15-ЛО) получали из ретикулоцитов, содержащих большое её количество [11]. В норме в крови ретикулоцитов мало (1,5–2%), их количество возрастает при кровопотерях или лизисе эритроцитов. Для увеличения доли ретикулоцитов в крови крысам вводили фенолгидразин (Sigma, USA), 50 мкг/г, лизирующий эритроциты [12]. Количество ретикулоцитов в крови определяли на препаратах, фиксированных метанолом и окрашенных по Гимзе. Подсчитывали 2000 клеток на препарат. Количество ретикулоцитов в крови достигало максимума через 5 сут после введения фенолгидразина. Величина максимума на разных крысах варьировала от 30 до 60% от всех клеток крови. В этот срок производили забор крови из сердца, клетки осаждали центрифугированием при 700 g, дважды отмывали в растворе Хэнкса pH 7,4 и лизировали на льду в течение 15 мин добавлением к осадку дистиллированной воды ($t=2-4^{\circ}\text{C}$). Все дальнейшие процедуры проводили при такой же температуре. Лизат клеток был доведён до pH 6,0 добавлением 0,1 М HCl. Остатки клеток удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин. Белок осаждали высаливанием сульфатом аммония в течение 2 ч, добавляя его в супернатант до 55% насыщения, затем центрифугировали при 10000 g, 20 мин и отделяли белковый осадок. Осадок растворяли в 0,1 М KH_2PO_4 и диализовали против этого же буфера. Гемоглобин используемой концентрацией сульфата аммония практически не высаливался, оставаясь в растворе, т. е. происходило разделение 15-ЛО (осадок) и гемоглобина. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 и 280 нм по формуле C (мг/мл) = $(E_{280} - 1,5) - (E_{260} - 0,76)$ [13].

Активность 15-липоксигеназы определяли по модифицированному методу [11]. Метод основан на спектрофотометрическом определении гидроперекисей, образующихся при окислении линолевой кислоты липоксигеназой и имеющих максимум поглощения при $\lambda=234$ нм. Коэффициент экстинкции гидроперекисей равен $25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14]. Реакционная смесь содержала 0,5 мМ линолевой кислоты (Sigma, США), 0,07% дезоксихолата Na (Диа М, Германия), 5% этанола в 0,1 М калий фосфатном буфере pH 7,4 с конечным объемом 2,0 мл. При быстром перемешивании добавляли белковый раствор, выделенный из ретикулоцитов. Регистрировали увеличение поглощения при 234 нм (A234/мин) на спектрофотометре Perkin-Elmer (M-40) при температуре 2–4°C и постоянном перемешивании. Спонтанное окисление линолевой кислоты было пренебрежимо мало за время регистрации. 15-ЛО является ферментом, активируемым продуктом — гидроперекисями [15], поэтому при использовании линолевой кислоты, не содержащей или содержащей мало гидроперекисей, 15-ЛО вначале мало активна — лаг-период, но активность возрастает по мере увеличения гидроперекисей. Скорость достигает максимума через 3–4 мин и увеличение концентрации гидроперекисей становится линейным во времени (рис. 1). Скорость окисления линолевой кислоты 15-ЛО (коэффициент V) определяли в программе Origin по линейному участку кривой увеличения гидроперекисей, описываемому уравнением: $Y=A+BX$, где Y — оптическая плотность, X — время.

Перед исследованием влияния ингибиторов на активность 15-ЛО были определены оптимальные условия измерения активности липоксигеназы. Активность 15-ЛО оказалась максимальной при концентрации дезоксихолата Na 0,07% (рис. 2). Активность 15-ЛО из ретикулоцитов возрастает с увеличением концентрации белка до 60 мкг/мл, а при дальнейшем увеличении концентрации белка активность уменьшается (рис. 3). Такой характер зависимости может быть объяснён тем, что в клетках есть белки восстанавливающие гидроперекиси — каталаза, пероксидазы. При определении влияния ингибиторов на активность 15-ЛО в реакционную смесь добавляли всегда 30 мкг/мл общего белка,

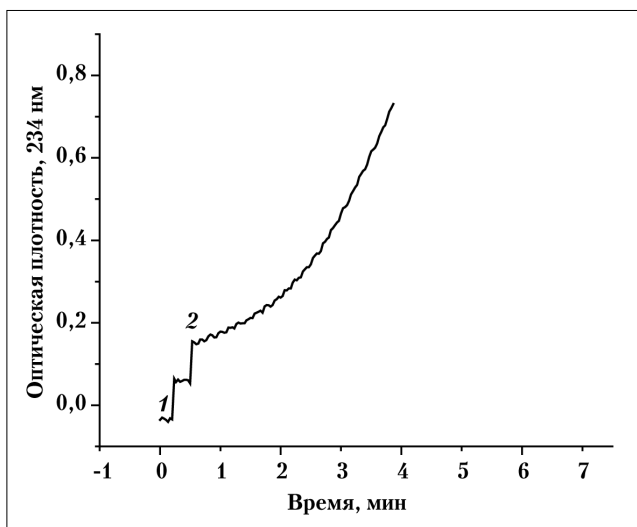


Рис. 1. Кинетика увеличения концентрации гидроперекиси линолевой кислоты в присутствии 15-ЛО, 30 мкг/мл.

1 — добавление белка; 2 — добавление линолевой кислоты. $V=12,6$ мкМ/мин.

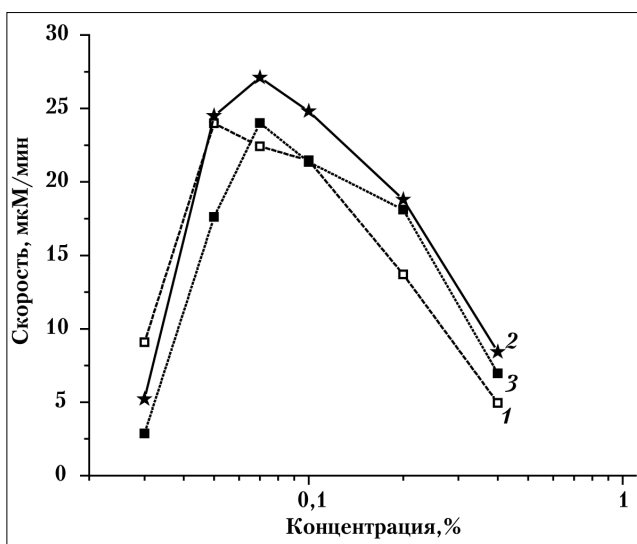


Рис. 2. Зависимость скорости окисления линолевой кислоты в присутствии 30 (1), 60 (2), 80 (3) мкг/мл белка из ретикулоцитов от концентрации дезоксиколата Na.

при этом скорость увеличения концентрации гидроперекиси была в интервале 12—18 мкМ/мин.

Экстракты грибов растворяли в этаноле до концентрации 13 мг/мл и в начале работы из этого матричного раствора готовили водные растворы, концентрация которых была в 100 раз больше конечной — в кювете. При этом была отмечена плохая воспроизводимость результатов. Мы предположили, что компоненты экстрактов плохо растворимы в воде и при водных разведениях налипают на гидрофобных поверхностях пластиковых пробирок и наконечников пипеток. Действительно, было показано, что экстракт комплекса грибов при концентрации 5 мкг/мл подавляет активность 15-ЛО при добавлении в кювету из спиртового раствора, но не действует, если делать промежуточные разведения водным раствором

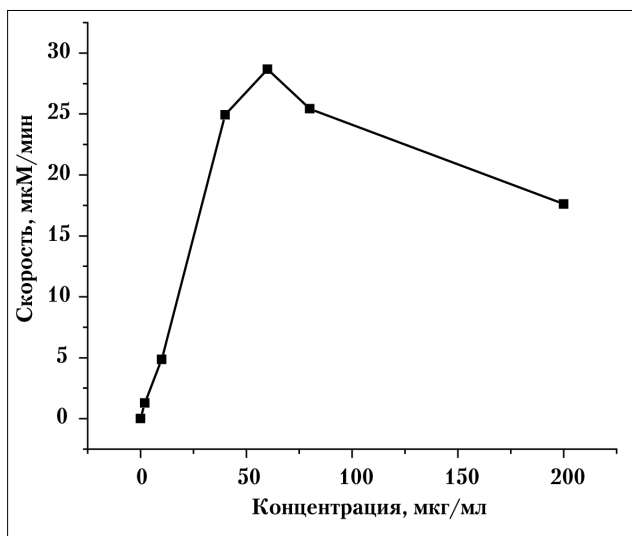


Рис. 3. Зависимость скорости окисления линолевой кислоты от концентрации белка из ретикулоцитов.

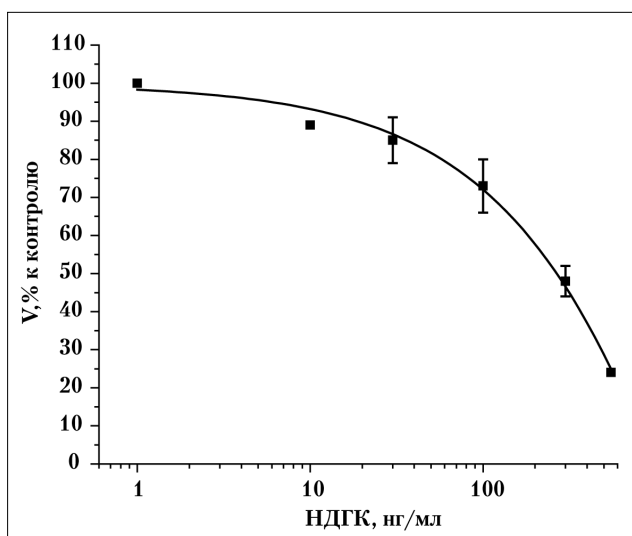


Рис. 4. Влияние НДГК на скорость окисления линолевой кислоты 15-липоксигеназой. $IC_{50}=270$ нг/мл.

(буфером). Поэтому в дальнейшей работе экстракты и их фракции добавляли в кювету только из спиртового раствора. Компоненты экстрактов, кроме того, налипали на стенки кюветы и оставались на стенках при её ополаскивании этанолом. Оставшиеся на стенках кюветы соединения экстрактов переходили в раствор при следующих измерениях, увеличивая лаг-период и уменьшая скорость реакции окисления линолевой кислоты 15-ЛО. Для устранения этого артефакта кювету мыли хромпиком после каждого измерения.

Данные, представленные на рисунках, представляют собой средние значения \pm стандартную ошибку среднего. Статистический анализ был проведен с помощью парного t-теста Стьюдента. Значение $p<0,05$ считалось значимым.

Результаты и обсуждение

Прежде чем исследовать влияние экстрактов грибов на активность 15-ЛО, необходимо было проверить методику на известном ингибиторе липоксигеназ — нордигидрогваяретовой кислоте

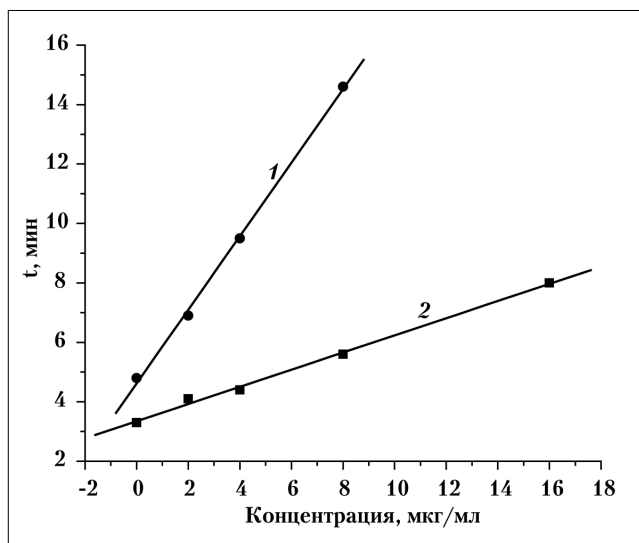


Рис. 5. Влияние экстракта комплекса грибов на лаг-период (t) окисления линолевой кислоты 0,5 (1) и 1 мМ (2) 15-липоксигеназой.

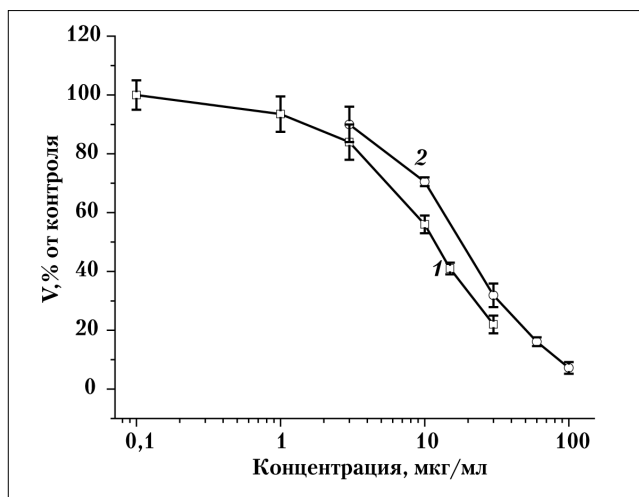


Рис. 6. Влияние экстрактов комплекса грибов (1) и *Lecanicillium lecanii* №169 (2) на скорость окисления линолевой кислоты 15-липоксигеназой. IC_{50} 1 = 12 мкг/мл, IC_{50} 2 = 15 мкг/мл.

(НДГК). Кроме того, определение IC_{50} НДГК необходимо для сравнения её ингибирующей активности с исследуемыми экстрактами. На рис. 4 приведены данные по влиянию НДГК на активность 15-ЛО. При выражении концентрации НДГК в логарифмическом масштабе уменьшение скорости реакции с увеличением концентрации аппроксимируется сигмоидной зависимостью. IC_{50} НДГК, определённое по этой кривой, равно 270 нг/мл.

При добавлении экстракта комплекса грибов в кювету сразу после линолевой кислоты лаг-период реакции окисления линолевой кислоты 15-ЛО увеличивается пропорционально добавленной концентрации (рис. 5). Это указывает на присут-

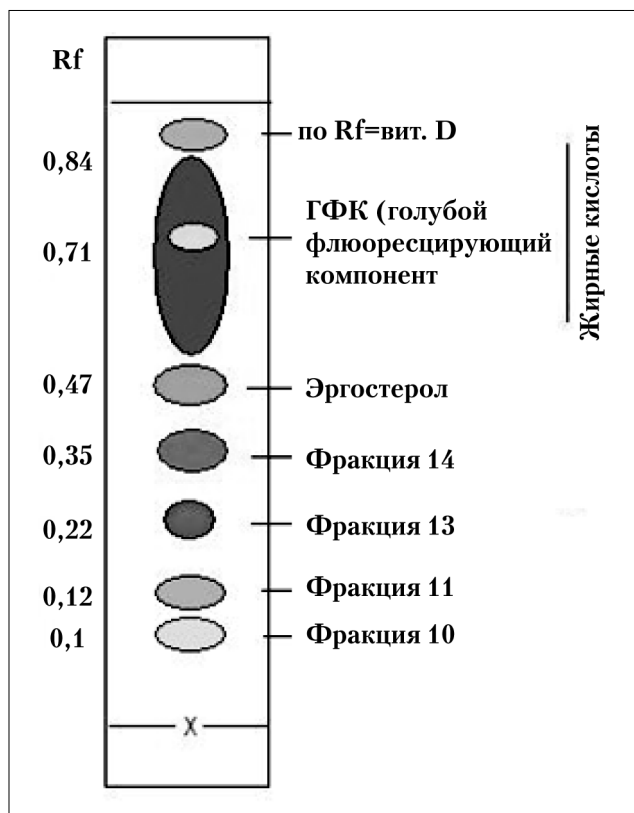


Рис. 7. Схема хроматограммы экстракта *Lecanicillium lecanii* №169.

ствии в экстракте ингибитора 15-ЛО, который тормозит накопление гидроперекисей, активирующих 15-ЛО. Причём ингибитор расходуется в реакции, поскольку, когда кривая накопления гидроперекисей выходит на линейный участок — полная активация 15-ЛО, то скорость реакции, например при концентрации экстракта комплекса, 8 мкг/мл, оказывается почти такой же (96%), как без ингибитора. Для определения влияния экстрактов и их фракций на скорость окисления линолевой кислоты 15-ЛО их добавляли в кювету в момент, когда начинался линейный участок кривой накопления гидроперекисей — при достижении оптической плотности 0,48.

На рис. 6 приведены данные по влиянию экстракта комплекса (кривая 1) на активность 15-ЛО. Видно, что экстракт комплекса содержит ингибитор 15-ЛО. С увеличением концентрации скорость реакции уменьшается, причём характер зависимости такой же, как при действии НДГК. IC_{50} свежеразведённого экстракта комплекса составляет 12 мкг/мл. Это в 44 раза выше, чем IC_{50} НДГК, что, впрочем, не свидетельствует о низкой эффективности ингибитора 15-ЛО из экстракта, поскольку неизвестно количественное содержание ингибитора в экстракте.

Экстракт комплекса грибов получали из трёх видов: *Lecanicillium lecanii* №169, *Beauveria fellina* №7, *Beauveria bassiana* №15. Экстракты грибов

Влияние фракций 10 и 11 на активность 15-ЛО

Вариант	V*, OD/мин	V/V _к , %
Контроль	0,076±0,005	100
Фракция 10, 0,5 мкг/мл	0,045±0,004	59
Фракция 10, 1 мкг/мл	0,043±0,003	56
Фракция 10, 2 мкг/мл	0,031±0,004	41
Фракция 11, 0,5 мкг/мл	0,045±0,003	59
Фракция 11, 1 мкг/мл	0,039±0,003	51
Фракция 11, 2 мкг/мл	0,036±0,002	47

Примечание. * — скорость образования гидроперекисей за вычетом спонтанного окисления линолевой кислоты (0,014 OD/мин).

Beauveria fellina №7 и *Beauveria bassiana* №15 не влияли на активность 15-ЛО в предельно растворимых в воде концентрациях — до 30 мкг/мл. В то время как, ингибирующая активность экстракта *Lecanicillium lecanii* №169 оказалась сравнимой с активностью полного комплекса грибов (рис. 6, кривая 2). IC₅₀ экстракта *Lecanicillium lecanii* №169, определённая по данным рис. 6, равна 15 мкг/мл, что близко к IC₅₀ экстракта комплекса грибов — 12 мкг/мл. Таким образом, ингибирующая 15-ЛО активность экстракта комплекса грибов обусловлена, в основном, компонентами, экстрагируемыми из гриба *Lecanicillium lecanii* №169.

Методом колоночной хроматографии было обнаружено наличие большого количества компонентов в экстракте *Lecanicillium lecanii* №169 (рис. 7): фракция с величиной R_f, сходной с витамином Д, содержит голубой флуоресцирующий компонент, большое количество жирных кислот, эргостерол, фракции, обозначенные 10 и 11, а также фракции 14 и 13, последняя проявляется после обработки хроматограммы парами йода. Флуоресцирующий компонент и эргостерол были не активны в максимально растворимых концентрациях (до 30 мкг/мл), а экстракт без 10- и 11-й фракций оказался мало активен в ингибировании 15-ЛО: IC₅₀=195 мкг/мл, что в 16 раз больше IC₅₀ цельного экстракта. Фракции 10 и 11 оказали ингибирующее действие на липоксигеназу при гораздо меньших концентрациях, чем цельный экстракт (табл. 1). Представленные в табл. 1 данные показывают, что обе фракции ингибируют 15-ЛО на 50% при концентрациях 1–2 мкг/мл. Фракции 10 и 11 почти на порядок эффективнее цельного экстракта, что указывает на обусловленность ингибирующей 15-ЛО активности экстракта соединениями, содержащимися в этих фракциях. Эти соединения были идентифицированы. Фракции были наработаны методом препаративной ВЭЖХ. С помощью методов 2D ЯМР(COSY, HSQC, HMBC) были определены физико-химические характеристики компонентов и их масс-спектры. Подтверждением правильности установленных структур являлось совпадение рассчитанных и экспериментальных спектров ЯМР¹³С. Структуры компонентов приведены на рис. 8.

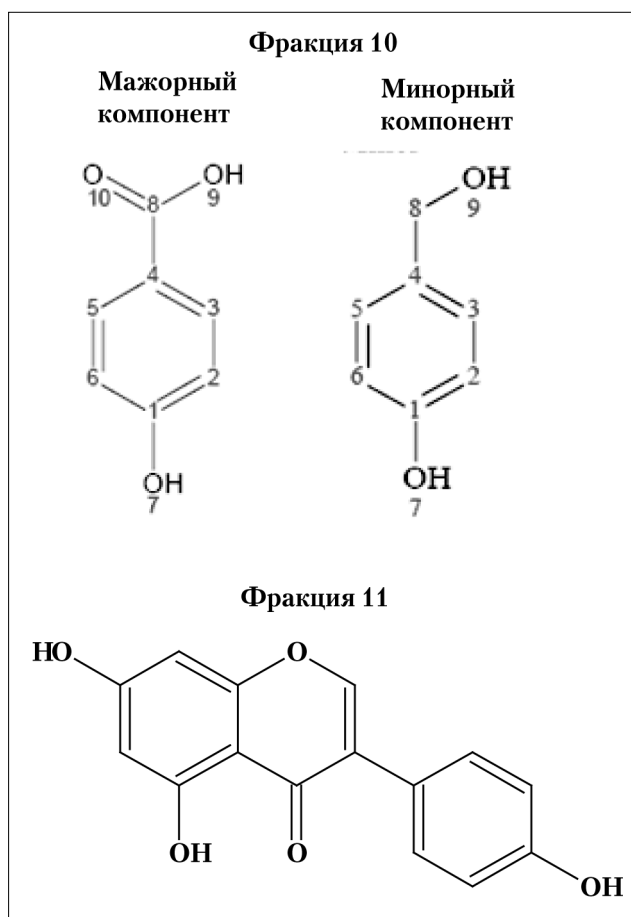


Рис. 8. Формулы компонентов фракций 10 и 11 экстракта *Lecanicillium lecanii* №169.

Фракция 10 состоит из двух компонентов: мажорного и минорного в отношении 2:1. Мажорный компонент фракции 10 — 4-гидроксibenзойная (пара-гидроксibenзойная) кислота, минорный — 4-гидроксibenзиловый спирт. Фармакологические свойства этих соединений не исследованы. Однако изомер пара-гидроксibenзойной кислоты — салициловая кислота (орто-гидроксibenзойная кислота) и её соли (салицилаты) давно известны и используются как противовоспалительные средства. Механизм этого эффекта обусловлен ингибированием факторов транскрипции, активируемых при воспалении [16, 17]. Поскольку атеросклероз —

воспаление сосудов, то этот механизм может реализоваться и в подавлении салицилатами атеросклероза. Салицилаты также препятствуют прикреплению лейкоцитов к эндотелию сосудов (процесс инициирующий атеросклероз), подавляя в клетках эндотелия экспрессию факторов адгезии [17, 18]. Кроме того, в биологических системах салицилаты проявляют себя как эффективные антиоксиданты [19]. Салицилаты подавляют окисление ЛПНП [20]. Роль ингибирования 15-ЛО в этом эффекте не изучалась.

Наработанная с помощью препаративной ВЭЖХ фракция 11 была исследована по всем физико-химическим характеристикам. Для фракции 11 был определен элементарный состав, соответствующий: С — 66,77%, Н — 3,73%, О — 29,60%. По данным МС-анализа, была установлена молекулярная масса $M/Z = 270,05$. Основываясь на данных элементарного состава и молекулярной массы, был проведён предварительный расчёт брутто формулы соединения: $C_{15}H_{10}O_5$. По результатам 1H , ^{13}C , НМВС, NOESY ЯМР-анализа было установлено, что данное вещество является генистеином (5,7-дигидрокси-3-(4-гидроксифенил)-4Н-хромон-4-один) (рис. 8). Известно, что флавоноиды, в том числе и изофлавоны, к которым относится генистеин, уменьшают риск сердечно-сосудистых заболеваний [21]. Существуют данные, показывающие, что существенный вклад в этот эффект даёт снижение флавоноидами окислительного стресса и увеличения концентрации NO в сосудах [22]. Генистеин понижает давление крови, увеличивает экспрессию NO синтазы в эндотелии сосудов [23] и подавляет окисление ЛПНП [24]. Было показано, что другой флавоноид, кверцетин подавляет окисление ЛПНП через ингибирование 15-ЛО [25]. Данные, полученные в нашей работе, свидетельствуют, что генистеин подавляет окисление ЛПНП, по видимому, также за счёт ингибирования 15-ЛО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чмель Я.В., Бибикова М.В., Спиридонова И.А., Тертов В.В., Катлинский А.В. Скрининг природных соединений с гиполлипидемической активностью. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 8—12. / *Chmel' Ja.V., Bibikova M.V., Spiridonova I.A., Tertov V.V., Katlinskij A.V.* Skrining prirodnykh soedinenij s gipolipidicheskoj aktivnost'ju. Antibiotiki i khimioter 2004; 49: 8—12. [in Russian]
2. Бибикова М.В., Пузевская Т.О., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Продукты гиполлипидемических соединений с антиоксидантной активностью. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 3—7. / *Bibikova M.V., Puzhevskaja T.O., Grammatikova N.E., Katlinskij A.V.* Produkty gipolipidemicheskikh soedinenij s antioksidantnoj aktivnost'ju. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 3—7. [in Russian]
3. Пузевская Т.О., Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Влияние природных гиполлипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 10—13. / *Puzhevskaja T.O., Bibikova M.V., Grammatikova N.E., Katlinskij A.V.* Vlijanie prirodnykh gipolipidemicheskikh soedinenij na formirovanie biopljonok shtammami roda *Pseudomonas*. Antibiotiki i khimioter 2009; 54: 10—13. [in Russian]
4. Mertens A., Hobvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J 2001; 15: 2073—2084.

Заключение

В работе показано, что экстракт комплекса грибов, проявляющий антиатеросклеротическую активность, ингибирует 15-ЛО. Поскольку 15-ЛО участвует в процессах, приводящих к развитию атеросклероза, то ингибирование 15-ЛО может иметь прямое отношение к подавлению развития атеросклероза экстрактом грибов. Ингибирующая 15-ЛО активность экстракта комплекса грибов обусловлена соединениями, содержащимися в одном из трёх грибов комплекса: *Lecanicillium lecanii* №169. Эти соединения были идентифицированы как 4-гидроксибензойная кислота, 4-гидроксибензиловый спирт и флавоноид генистеин. Фармакологические эффекты первых двух соединений не исследованы. Полученные данные по ингибированию ими 15-ЛО побуждают к изучению фармакологических эффектов 4-гидроксибензойной кислоты и 4-гидроксибензинового спирта, в том числе и их влияния на развитие атеросклероза. Третье идентифицированное в активных фракциях гриба *Lecanicillium lecanii* №169 соединение — флавоноид генистеин, эффекты которого изучены в различных аспектах. Известно, в том числе, что он препятствует развитию атеросклероза. Ингибирование фракцией, содержащей генистеин 15-ЛО, показывает, что часть антиатеросклеротического действия генистеина может быть обусловлена подавлением активности 15-ЛО. Основными продуцентами генистеина являются соя и красный клевер. При этом следует отметить, что в растениях это соединение находится в виде гликозидов. Получение чистого генистеина представляет определённые сложности. В частности, в Японии ведётся поиск ферментов, способных удалять гликозидную часть. Поэтому впервые обнаруженная в работе способность гриба продуцировать чистый генистеин может иметь как теоретическое, так и практическое значение.

5. Tsimikas S., Mallat Z., Talmud P.J., Kastelein J.J., Wareham N.J., Sandhu M.S. et al. Oxidation-specific biomarkers, lipoprotein(a), and risk of fatal and nonfatal coronary events. J Am Coll Cardiol 2010; 56: 946-955.
6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. С-Петербург: Питер Ком. 1999. / *Klimov A.N., Nikul'cheva N.G.* Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narushenija. S-Peterburg: Piter Kom. 1999. [in Russian]
7. Fogelman A.M., Schechter J.S., Hokom M., Child J.S., Edwards P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2214—2218.
8. Sparrow J.T., Parthasarathy S., Steinberg D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. J Lipid Res 1988; 29: 745—753.
9. Hiltunen T., Luoma J., Nikkari T., Ylä-Herttuala S. Induction of 15-lipoxygenase mRNA and protein in early atherosclerotic lesions. Circulation 1995; 92: 3297—3303.
10. Harats D., Shaish A., George J., Mulkins M., Kurihara H., Levkovitz H. et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. ATVB 2000; 20: 2100—2105.

11. *Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W., Ludwig P., Janicke-Hone et al.* The lipoxygenase of reticulocytes: purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem* 1979; 96: 545–561.
12. *Criswell K.A., Sulkunen A.P., Hochbaum A.F., Bleavins M.R.* Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2000; 20: 25–34.
13. *Мешкова Н.П., Северина С.Е.* Практикум по биохимии. М.: МГУ; 1979. / *Meshkova N.P., Severina S.E.* Praktikum po biokhimii. M.: MGU; 1979. [in Russian]
14. *Maccarone M., Salucci M.L., Melino G., Rosato N., Finazzi-Agro A.* The early phase of apoptosis in human neuroblastoma chp100 cells is characterized by lipoxygenase-dependent ultraweak light emission. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 265: 758–762.
15. *Aoshima H., Kajiwara T., Hatanaka A.* Kinetic study of lipoxygenase-hydroperoxylinoleic acid interaction. *Biochim Biophys Acta* 1976; 486: 121–126.
16. *Kopp E., Ghosh S.* Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956–959.
17. *Pierce J.W., Read M.A., Ding H., Lusinskas F.W., Collins T.* Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996; 156: 3961–3969.
18. *Xia L., Pan J., Yao L., McEver R.P.* A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood* 1998; 91: 1625–1632.
19. *Sagone A., Husney R.* Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol* 1987; 138: 2177–2183.
20. *Hermann M., Kapiotis S., Hofbauer R., Exner M., Seelos C., Held I et al.* Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Letters* 1999; 445: 212–214.
21. *Maron D. J.* Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr. Atherosclerosis Rep* 2004; 6: 73–78.
22. *Grassi D., Desideri G., Ferri C.* Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2010; 2: 889–902.
23. *Si H., Liu D.* Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2008; 138: 297–304.
24. *Hodgson J.M., Croft K.D., Puddey I.B., Mori T.A., Beilin L.J.* Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 664–669.
25. *Da Silva E. L., Tsushida T., Terao J.* Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349: 313–320.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Бибикова Маргарита Васильевна — д.м.н., генеральный директор ООО «ВИОРИН», Москва

Спиридонова Инна Анатольевна — с.н.с., ООО «ВИОРИН», Москва

Даниленко А.Н. — с.н.с., Институт биохимической физики им. Н.М.Эммануэля РАН, Москва

Корыстова А.Ф. — с.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино

Шапошникова В. В. — к.б.н., с.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино

Корыстов Ю. Н. — д.б.н., зав. лаб., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино